

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**



TESIS DOCTORAL

**Estudio del transporte de esteroides en
Mycobacterium smegmatis mc²155 y sus
aplicaciones biotecnológicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Julia García Fernández

DIRECTORES

**José Luis García López
Beatriz Galán Sicilia**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

**Estudio del transporte de esteroides en *Mycobacterium*
smegmatis mc²155 y sus aplicaciones biotecnológicas**

JULIA GARCÍA FERNÁNDEZ

DIRECTORES:

Dr. JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ

Dra. BEATRIZ GALÁN SICILIA

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



MADRID, 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer al profesor José Luis García el haberme dado la oportunidad de desarrollar mi Tesis Doctoral en su laboratorio. Gracias por las interminables conversaciones y por transmitir esa pasión por la ciencia que le hace a uno no rendirse ante las dificultades y seguir intentándolo. Ha sido un placer trabajar contigo estos años y aprender a tu lado. Gracias a la Doctora Beatriz Galán, por ser codirectora de esta Tesis, pero por encima de todo, compañera. Gracias Bea por estar siempre ahí en esos momentos de crisis a mitad de un experimento, por transmitir tu sabiduría, por enseñarme a ser práctica y tener siempre una palabra de aliento en los momentos difíciles.

Gracias a los Rubenes, ha sido un placer compartir con todos vosotros estos cuatros años y medio. Todos y cada uno de vosotros, sin excepción, habéis contribuido con vuestro granito de arena en esta Tesis, ya sea a nivel científico o con vuestro apoyo moral en los momentos clave. Los años pasan, unos van, otros vienen, pero el espíritu “rubenil” siempre está ahí, se lleva en la sangre. No dejéis que nunca muera.

Quisiera dar las gracias desde aquí al profesor Christopher M. Sassetti, de la University of Massachusetts Medical School (UmassMed), por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio y aprender todas las técnicas que sé sobre biología molecular en Micobacterias. Gracias a todos los integrantes del laboratorio, y muy especialmente al Doctor Kadamba Papavinasasundaram, por su ayuda y sus consejos científicos.

También quisiera agradecer a toda la gente del CIB con los que he podido interaccionar durante estos años por el buen ambiente y por las maravillosas fiestas de primavera. Gracias a los servicios de Protección radiológica, Proteómica, Fotografía, Cromatografía de gases, Química e Ingeniería de Proteínas y Secuenciación (Secugen), por su ayuda durante estos años.

Y finalmente y no por ello menos importante, gracias a toda mi familia por el apoyo incondicional durante estos duros años. Gracias a mis padres, M. Jesús y Juan Carlos, porque si he llegado hasta aquí ha sido por vosotros, porque sin vuestro apoyo esto no hubiera sido posible. Gracias por los valores que me habéis inculcado desde pequeña, por enseñarme a luchar por lo que quiero y no rendirme nunca.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VII
I. SUMMARY	1
1. Introduction	3
2. Objectives and results	3
3. Conclusions	4
II. RESUMEN	7
1. Introducción	9
2. Objetivos y resultados	9
3. Conclusiones	10
III. INTRODUCCIÓN	13
1. El colesterol y los compuestos esteroideos	15
1.1. Los esteroideos y esteroides	15
1.2. Importancia de los esteroideos como contaminantes ambientales	16
1.3. Interés industrial y biotecnológico de los esteroideos	17
2. Degradación bacteriana de esteroideos	19
2.1. Bacterias degradadoras de compuestos esteroideos	19
2.2. Degradación aeróbica del colesterol	22
2.3. Regulación de la expresión de los genes del metabolismo del colesterol	25
3. Transporte de lípidos y moléculas esteroideas en bacterias	26
3.1. Transporte en bacterias Gram-negativas	26
3.2. Transporte en bacterias Gram-positivas	27
3.3. Transporte en micobacterias	28
3.3.1. La pared celular micobacteriana	29
3.3.1.1. Membrana plasmática o interna	31
3.3.1.2. Complejo mAGP	32
3.3.1.3. Membrana externa o cápsula	34
4. Operones <i>mce</i>	35
4.1. Transportadores de tipo ABC	37
4.1.1. Tipos de importadores ABC	37
4.1.2. Componentes de los importadores ABC	38
4.2. Componentes de los operones <i>mce</i>	41
4.2.1. Proteínas transmembrana o permeasas (TMDs)	41
4.2.2. Proteínas de unión a sustrato (SBPs)	42
4.2.3. Proteínas asociadas a los transportadores Mce (Mas)	43
4.2.4. Componente ATPasa	43
4.2.5. Otras proteínas que interaccionan con los operones <i>mce</i>	44
4.3. Funciones asociadas a los operones <i>mce</i>	45
4.3.1. Operones <i>mce1</i> , <i>mce2</i> y <i>mce3</i>	45

4.3.2. Operón <i>mce4</i>	46
4.4. Regulación de los operones <i>mce</i>	47
IV. OBJETIVOS	49
V. MATERIALES Y MÉTODOS	53
1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	55
2. Medios y condiciones de cultivo	62
2.1. Medios de cultivo empleados para <i>E. coli</i>	63
2.2. Medios de cultivos empleados para <i>R. erythropolis</i>	63
2.3. Medios de cultivo empleados para <i>M. smegmatis</i>	63
2.4. Medios de cultivo empleados para <i>C. glutamicum</i>	64
2.4.1. Ensayos de biotransformación de esteroides con células en reposo de <i>C. glutamicum</i>	64
2.5. Protocolo de disolución de esteroides	65
2.6. Conservación de las cepas bacterianas	65
3. Experimentos de transferencia genética	65
3.1. Transformación de células de <i>E. coli</i>	65
3.2. Transformación de células de <i>M. smegmatis</i>	66
3.2.1. Preparación de células competentes de <i>M. smegmatis</i>	66
3.2.2. Transformación de células de <i>M. smegmatis</i> mediante electroporación	66
3.3. Transformación de células de <i>R. erythropolis</i>	66
3.3.1. Preparación de células electrocompetentes de <i>R. erythropolis</i>	66
3.3.2. Transformación de células de <i>R. erythropolis</i> mediante electroporación	67
3.4. Transformación de células de <i>C. glutamicum</i>	67
3.4.1. Preparación de células electrocompetentes de <i>C. glutamicum</i>	67
3.4.2. Transformación de células de <i>C. glutamicum</i> mediante electroporación	68
4. Técnicas de manipulación de ADN	68
4.1. Electroforesis en geles de agarosa	68
4.2. Extracción de ADN cromosómico de <i>M. smegmatis</i>	68
4.3. Aislamiento de ADN plasmídico en <i>E. coli</i> y <i>M. smegmatis</i>	69
4.4. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)	69
4.4.1. PCR de colonia en <i>E. coli</i>	69
4.4.2. PCR de colonia o de cultivo líquido en <i>M. smegmatis</i> , <i>R. erythropolis</i> y <i>C. glutamicum</i>	70
4.5. Secuenciación de ADN	70
4.6. Construcción de mutantes por delección mediante el sistema pJQ200x de doble recombinación homóloga en <i>M. smegmatis</i>	70
4.7. Construcción de mutantes por delección mediante el sistema RecET en <i>M. smegmatis</i>	71
4.7.1. Construcción de mutantes por inserción mediante el sistema RecET	73

4.7.2. Construcción de mutantes por delección mediante el sistema RecET	74
4.8. Sistema de clonaje Gateway Multisite	76
4.9. Creación de mutaciones puntuales en dominios específicos de las permeasas YrbE4	79
5. Técnicas de manipulación de ARN	80
5.1. Extracción de ARN de <i>M. smegmatis</i>	80
5.2. Extracción de ARN de <i>C. glutamicum</i>	81
5.3. Retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR)	82
5.4. PCR en tiempo real (qRT-PCR)	82
6. Técnicas de manipulación de proteínas	83
6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)	83
6.2. Obtención de extractos proteicos de <i>M. smegmatis</i> y <i>R. erythropolis</i>	83
6.3. Ensayos enzimáticos <i>in vitro</i> de actividad deshidrogenasa	83
6.4. Técnica de <i>Western blot</i>	84
7. Técnicas cromatográficas	84
7.1. Extracción de esteroides	84
7.2. Cromatografía en capa fina (TLC)	84
7.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS)	85
7.3.1. Detección y cuantificación de colesterol y colesteno en ensayos <i>in vitro</i>	85
7.3.2. Detección y cuantificación GP175-OL y GP175-ONA	86
7.4. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)	87
7.4.1. Detección y cuantificación de dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona (AD)	87
7.4.2. Detección y cuantificación de pregnenolona y progesterona	88
8. Estudios fenotípicos	88
8.1. Estudios de agregación	88
8.2. Estudios de morfología de colonia con Rojo Congo	89
9. Ensayos de transporte con colesterol radiactivo	89
10. Extracción de ácidos micólicos (MAMEs)	89
11. Técnicas de fluorescencia	90
12. Análisis bioinformáticos	90
VI. RESULTADOS	93
1. Caracterización de la ATPasa que energiza el sistema de transporte activo de colesterol en <i>M. smegmatis</i> mc²155	95
1.1. Identificación <i>in silico</i> de la ATPasa implicada en el transporte activo de colesterol en <i>M. smegmatis</i> .	94
1.1.1. Estimación de la interacción proteica del gen <i>MSMEG_1366</i> mediante análisis bioinformáticos.	99
1.2. Análisis de la expresión génica del gen <i>MSMEG_1366</i> (<i>mceG</i>) mediante qRT-PCR	100

1.3. Estudio mutacional de la ATPasa MceG	102
1.3.1. Ensayos de transporte de colesterol con radiactividad	108
1.4. Estudio fenotípico del mutante <i>M. smegmatis</i> Δ1366	109
1.5. Análisis de la composición de ácidos micólicos en el mutante <i>M. smegmatis</i> Δ1366	111
1.6. Análisis de la estructura de membrana del mutante <i>M. smegmatis</i> Δ1366 mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)	115
1.7. Estudios de localización celular de los operones mce mediante técnicas de fluorescencia	116
1.8. Análisis de la región C-terminal de la ATPasa MceG	117
1.8.1. Estudios de crecimiento en colesterol de las versiones truncadas de la ATPasa MceG	120
1.8.2. Estudios de expresión de las versiones truncadas de la ATPasa MceG mediante <i>Western blot</i>	122
1.8.3. Comparación de la localización celular de la ATPasa nativa con respecto a las versiones truncadas mediante técnicas de fluorescencia	123
2. Estudio del operón <i>mce4</i> y su implicación en el transporte activo de colesterol en <i>M. smegmatis</i> mc²155	125
2.1. Estudio <i>in silico</i> del operón <i>mce4</i> implicado en el transporte activo de colesterol en <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.	125
2.1.1. Componentes permeasas YrbE4AB	125
2.1.2. Componentes de unión a sustrato (SBPs) Mce4ABCDEF	128
2.1.3. Proteínas Mas (Mce associated proteins) Mas4AB	131
2.1.4. Análisis de la interacción proteica de los genes del operón <i>mce4</i> en <i>M. smegmatis</i> mediante análisis de tipo bioinformático.	131
2.2. Análisis de la expresión génica del gen <i>MSMEG_5899 (mce4B)</i> mediante qRT-PCR	133
2.3. Estudio mutacional del operón <i>mce4</i>	136
2.3.1. Ensayos de transporte de colesterol con radiactividad	140
2.4. Estudios fenotípicos de los mutantes del operón <i>mce4</i>	141
2.5. Análisis de la composición de ácidos micólicos en el mutante <i>M. smegmatis</i> Δmce4	144
2.6. Estudio del dominio EExDA de las permeasas YrbE4 del operón <i>mce4</i>	145
3. Aplicaciones biotecnológicas del estudio del transporte de esteroides	151
3.1. Caracterización de la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa que cataliza el primer paso de la degradación del colesterol en <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	151
3.1.1. Modelado de la proteína MSMEG_5228	151
3.1.2. Clonaje y expresión heteróloga del gen <i>MSMEG_5228</i> en <i>E. coli</i>	155
3.1.2.1. Ensayos enzimáticos con extractos proteicos de <i>E. coli</i> BL21 (pET5228)	156

3.1.3. Utilización de <i>R. erythropolis</i> IGTS8 como hospedador para la expresión heteróloga de la enzima MSMEG_5228	156
3.1.3.1. Clonaje y expresión heteróloga del gen <i>MSMEG_5228</i> en <i>R. erythropolis</i> IGTS8	156
3.1.3.2. Caracterización bioquímica de la enzima recombinante MSMEG_5228 producida en <i>R. erythropolis</i> IGTS8	157
3.1.3.2.1. Estudio de la especificidad de sustrato de la deshidrogenasa MSMEG_5228	157
3.1.3.2.2. Dependencia de cationes de la actividad 3 β HSD	159
3.1.3.2.3. Dependencia de la fuerza iónica de la actividad 3 β HSD	160
3.1.3.2.4. Dependencia de otros factores sobre la actividad 3 β HSD	160
3.1.3.3. Efectos de la hiperexpresión de la proteína MSMEG_5228 en la cepa <i>R. erythropolis</i> (pTip5228)	161
3.1.3.4. Identificación del producto de la reacción mediante LC-MS	161
3.2. Utilización de <i>C. glutamicum</i> como hospedador heterólogo en biotransformaciones esteroideas	163
3.2.1. Clonaje del gen <i>MSMEG_5228</i> en <i>C. glutamicum</i> R31	164
3.2.1.1. Biotransformación de compuestos esteroideos por la cepa recombinante <i>C. glutamicum</i> (pCGL5228)	164
3.2.1.1.1. Biotransformación de dehidroepiandrosterona (DHEA) en androstenediona (AD)	165
3.2.1.1.2. Biotransformación de pregnenolona en progesterona	169
3.2.1.1.3. Biotransformación de GP175-OL en GP175-ONA	172
3.2.2. Clonaje del sistema de transporte Mce4 en el hospedador heterólogo <i>C. glutamicum</i> R31	175
3.2.2.1. Biotransformación de colesterol en colesteno utilizando la cepa <i>C. glutamicum</i> (pECmce4op) (pCGL_DA).	177
3.2.2.2. Análisis de la expresión transcripcional del operón <i>mce4</i> en <i>C. glutamicum</i>	179
VII. DISCUSIÓN	181
1. Identificación y caracterización del sistema de transporte activo de colesterol en <i>M. smegmatis</i> mc²155	183
1.1. Identificación y análisis <i>in silico</i> del operón <i>mce4</i> y la ATPasa MceG en <i>M. smegmatis</i>	183
1.2. Análisis del operón <i>mce4</i> y del gen <i>mceG</i> como sistema de transporte de colesterol en <i>M. smegmatis</i>	185
1.3. Implicación de los sistemas Mce en funciones de remodelación de la envoltura celular	189
1.4. Estudio de la región C-terminal de la ATPasa MceG y su implicación en el transporte de colesterol en <i>M. smegmatis</i> .	193

1.5. Estudio del motivo EExDA presente en las proteínas YrbE4 y su implicación en el transporte de colesterol en <i>M. smegmatis</i> .	197
2. Aplicaciones biotecnológicas	197
2.1. Caracterización de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) que cataliza el primer paso de degradación de colesterol en <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	197
2.2. Uso industrial de <i>C. glutamicum</i> como hospedador heterólogo en biotransformaciones esteroideas de interés.	200
VIII. CONCLUSIONES	205
IX. BIBLIOGRAFÍA	209

ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
3-HSA	3-hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(19)-trien-9,17-diona
3,4-DHSA	3,4-dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona
4,9-DSHA	4,5,9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(19),2-dien-4-oico
3β-HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
5OH-HIP	Propionato de 5-hidroxi-metilhexahidro-1-indanona
9OH-AD	9-hidroxi-4-androsten-3,17-diona
9OH-ADD	9-hidroxi-4-androstadien-3,17-diona
11OH-AD	11-hidroxi-1,4-androsten-3,17-diona
aa	Aminoácido(s)
AD	4-androsten-3,17-diona
ADD	1,4-androstadien-3,17-diona
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Ap^R	Resistencia a ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNP	ARN polimerasa
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
C	Citosina
ChOx	Colesterol oxidasa
Ci	Curio
CoA	Coenzima A
Da	Dalton
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTD	Desoxinucleótido trifosfato
DO₆₀₀	Densidad óptica medida a 600 nm
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
G	Guanina
Gm^R	Resistencia a gentamicina
h	Hora
HIP	Ácido 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostan-5-oico
HsaAB	3-hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona 4 hidroxilasa
HsaC	3,4-dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona dioxigenasa

Abreviaturas

HsaD	Ácido 4,5-9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-dien-4-oico hidroxilasa
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalatopiranosido
kDa	1000 Dalton
Km^R	Resistencia a kanamicina
KshAB	3-cetoesteroide-9 α -hidroxilasa
KstD	3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa
Kv	Kilovoltios
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani (Lysogeny broth)
min	Minuto
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADP	Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido
NCBI	<i>National Center For Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramos
nm	Nanómetro
nt	Nucleótido(s)
p/v	Relación peso/volumen
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RBS	Secuencia de unión al ribosoma
rpm	Revoluciones por minuto
Rt	Tiempo de retención
RT-PCR	Reacción de retrotranscripción acoplada a PCR
SDS	Dodecilsulfato sódico
T	Timina
TB	Medio de cultivo <i>Terrific Broth</i>
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
TE	Tampón Tris-EDTA
Tris	Tri(hidroximetil)aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
UV	Ultravioleta

V	Voltio
v/v	Relación volumen-volumen
µg	Microgramos
µF	Microfaradio
µM	Micromolar
Ω	Ohmio

I. SUMMARY

Study of steroid uptake in *Mycobacterium smegmatis* mc²155 and its biotechnological applications

1. Introduction

Due to the clinical, industrial and environmental cholesterol importance, the microorganisms able to degrade it have been selected for more than 70 years (Söhnngen, 1913; Turfitt, 1944) despite this fact, nowadays most of the genetic and biochemical basis of its degradation pathways are still unknown. The fully elucidation of these metabolic pathways would lead to the development of new biotechnological processes in the pharmaceutical industry for the production of steroids. Moreover and since cholesterol has been linked to the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* (Pandey and Sassetti, 2008; Joshi *et al.*, 2006), the study of these routes has recently acquired a large interest from a clinical point of view.

Although one of the key elements in the bacterial metabolism of cholesterol is the uptake process, the knowledge about the selective transport of steroids in bacteria is low. Bacteria able to degrade cholesterol possess an operon called *mce4* that encodes an ABC system responsible for its transport into the cell (Pandey and Sassetti, 2008; Mohn *et al.*, 2008). This operon contains 10 genes, *yrbE4ABmce4ABCDEFmas4AB*, two of which encode the permeases of the system and the rest, of unknown function, are postulated to encode the substrate binding proteins. Additionally, the ATPase activity of this ABC system is provided by the *mceG* gene (*MSMEG_1366*) encoding an Mkl enzyme that is located away from the *mce4* operon and is shared with other Mce systems that are present in the same cell (Joshi *et al.*, 2006).

2. Objectives and results

Given the great interest in the study of the cholesterol uptake, the objectives of this Thesis have been focused on the study of this process using *M. smegmatis* as a model and genetic and biochemical analysis in order to apply the acquired knowledge in biotechnological purposes. The main results obtained have allowed us to determine that the steroid uptake system in *M. smegmatis* depends on the structure and availability of these compounds. Thus, steroids without side chain such as androstenedione or with a short side chain as pregnenolone are able to diffuse through the membrane without the need of a specific transporter. As for steroids with a more complex structure such as cholesterol and phytosterols, the mechanism of uptake is dependent on its availability in the environment so that when these compounds are found in high concentration levels they are able to enter by passive diffusion but when the availability is low it is required the Mce4 system to actively uptake them. The correct function of this active transport requires all of the 10 proteins that are present in the *mce4* operon as well as the ATPase MceG to generate a functional transporter. In addition, this ATPase has a C-terminal extension that appears to be involved in the binding to auxiliary proteins, so despite the already

large number of existing components in the *mce4* operon, the results obtained in this Thesis seem to extend its complexity suggesting the involvement of a larger number of proteins in the cholesterol uptake.

The study of the Mce4 system has also allowed us to propose that it carries out additional functions in addition to the cholesterol uptake. In this regard, the appearance of altered morphologies in the specific mutants of this system indicates its involvement in transport processes of lipid components present in the cell envelope of *M. smegmatis*. While similar functions have been postulated for other Mce systems (Dunphy *et al.*, 2010; Marjanovic *et al.*, 2011., Santangelo *et al.*, 2009), the relation of the *mce4* operon with this type of processes is novel to date and suggests that steroidal compounds probably are able to use the Mce4 system to be transported into the cell due to its structural similarity to lipids of the cell envelope.

Despite the growing knowledge on the cholesterol degradation pathway in the genera *Mycobacterium* and *Rhodococcus*, the use of these organisms in biotransformations of industrial interest has several disadvantages arising from the presence of an endogenous steroid metabolism, so the search for heterologous organisms to perform these biotransformations is one of the most promising alternatives. In this sense, the studies derived from this Thesis about the uptake mechanisms of different steroids of interest in the biotechnological industry as well as the characterization of the MSMEG_5228 dehydrogenase, have allowed us to verify the potential of *Corynebacterium* as an heterologous host in the industrial production of steroid compounds.

3. Conclusions

- The Mce4 active transport system of cholesterol in *M. smegmatis* requires at least 11 proteins to generate a functional transport system. These proteins include an ATPase (MceG), two permease subunits (YrbE4) and eight additional proteins of unknown function (Mce4ABCDEFMas4AB), any of which can't be replaced by the homologous subunits that are present in the other *mce* operons of *M. smegmatis* mc²155.
- The ATPase MceG has a C-terminal extension not conserved in other similar ABC ATPases that could bind to additional proteins to those present in the *mce4* operon and whose binding is necessary for the proper active transport of cholesterol in *M. smegmatis* mc²155.
- *Mycobacterium smegmatis* has a system of passive transport of steroids that is independent of the Mce4.
- Mce systems including the Mce4 whose function has been only associated to date with cholesterol uptake, might be also involved in transport processes of lipid components present in the cell envelope of *M. smegmatis* mc²155 under stress conditions. This fact suggests that

probably the steroidal compounds are transported using the Mce4 system because of its structural similarity to some of the cell envelope lipids.

- *Corynebacterium glutamicum*, a microorganism without endogenous steroid metabolism, has been proven to have potential as a biotechnological chassis for expression of heterologous genes in steroid biotransformations.

II. RESUMEN

Estudio del transporte de esteroides en *Mycobacterium smegmatis* mc²155 y sus aplicaciones biotecnológicas

1. Introducción

Debido a la importancia clínica, industrial y medio ambiental del colesterol, desde hace más de 70 años se han seleccionado microorganismos capaces de degradarlo (Söhngen, 1913; Turfitt, 1944), sin embargo hoy en día aún se desconocen gran parte de las bases genéticas y bioquímicas de las rutas de degradación de este compuesto. Dilucidar completamente estas rutas metabólicas permitiría desarrollar nuevos procesos biotecnológicos en la industria farmacéutica para la producción de esteroides. Por otro lado y dado que el colesterol se ha relacionado con la patogénesis de *Mycobacterium tuberculosis* (Pandey y Sassetti, 2008; Joshi *et al.*, 2006), el estudio de estas rutas ha adquirido recientemente un elevado interés desde un punto de vista clínico.

Aunque uno de los elementos claves del metabolismo bacteriano del colesterol es su transporte, hasta la fecha, el conocimiento sobre el transporte selectivo de esteroides en bacterias es escaso. Las bacterias que degradan colesterol poseen un operón denominado *mce4* que codifica un sistema de tipo ABC responsable de su transporte al interior de la célula (Pandey y Sassetti, 2008; Mohn *et al.*, 2008). Este operón contiene 10 genes, *yrbE4ABmce4ABCDEFmas4AB*, dos de los cuales codifican las permeasas del sistema y el resto, de función desconocida, se postula que codifican las proteínas de unión al sustrato. Además, la actividad ATPasa del sistema ABC es proporcionada por el gen *mceG* (*MSMEG_1366*) que codifica una enzima tipo Mkl, localizado lejos del operón *mce4*, y que comparte con otros sistemas Mce similares de función desconocida presentes en la misma célula (Joshi *et al.*, 2006).

2. Objetivos y resultados

Dado el gran interés en el estudio del transporte de colesterol, los objetivos de esta Tesis Doctoral se han centrado en el estudio de este proceso utilizando como modelo *M. smegmatis* y abordándolo mediante análisis genéticos y bioquímicos para facilitar su posterior aplicación con fines biotecnológicos. Los principales resultados obtenidos han permitido determinar que *M. smegmatis* posee un sistema de transporte de esteroides dependiente de la estructura y disponibilidad en el medio de los distintos esteroides. De esta manera, los esteroides sin cadena lateral como la androstenediona o con cadena lateral corta como la pregnenolona son capaces de difundir a través de la membrana sin necesidad de un transportador específico. En cuanto a los esteroides con estructura más compleja como el colesterol y los fitosteroles el mecanismo de transporte es dependiente de su disponibilidad en el medio, de tal manera que dependiendo de su concentración son capaces de entrar por difusión pasiva cuando la disponibilidad de estos compuestos es alta pero necesitan del sistema de transporte activo Mce4 cuando la

disponibilidad del esteroide es baja. El correcto funcionamiento de este transporte activo requiere la totalidad de las 10 proteínas presentes en el operón *mce4* así como de la ATPasa MceG para generar un transportador funcional. Además, esta ATPasa posee una extensión C-terminal que parece estar implicada en la unión a proteínas auxiliares, por lo que a pesar del elevado número de componentes existentes en el operón *mce4*, los estudios de esta Tesis Doctoral parecen ampliar su complejidad sugiriendo la implicación de un mayor número de proteínas en el transporte de colesterol.

El estudio del sistema Mce4 ha permitido también proponer para este transportador funciones adicionales a las del transporte de colesterol. En este sentido, la aparición de morfologías alteradas en los mutantes específicos de este sistema indica una implicación del mismo en procesos de transporte de lípidos de la envoltura celular de *M. smegmatis*. Mientras que funciones similares han sido postuladas para otros sistemas Mce (Dunphy *et al.*, 2010; Marjanovic *et al.* 2011; Santangelo *et al.*, 2009), la relación del operón *mce4* con este tipo de procesos es hasta la fecha novedosa y sugiere que probablemente los compuestos esteroideos son capaces de utilizar el sistema Mce4 para transportarse al interior celular gracias a su similitud estructural con lípidos de la envoltura celular.

Pese al creciente conocimiento que existe sobre la ruta de degradación del colesterol en los géneros *Mycobacterium* y *Rhodococcus*, el uso de estos organismos en biotransformaciones de interés industrial presenta diversos inconvenientes derivados de la presencia de un metabolismo endógeno de degradación de esteroides, por lo que la búsqueda de organismos heterólogos para la biotransformación de esteroides constituye una de las alternativas más prometedoras. En este sentido los estudios derivados de esta Tesis Doctoral acerca de los mecanismos de transporte de diversos esteroides de interés en la industria biotecnológica así como la caracterización de la deshidrogenasa MSMEG_5228, han permitido verificar la potencialidad de *Corynebacterium* como hospedador heterólogo en la producción industrial de compuestos esteroideos.

3. Conclusiones

- El transporte activo de colesterol Mce4 en *M. smegmatis* requiere de al menos 11 proteínas para generar un sistema de transporte funcional. Estas proteínas incluyen una ATPasa (MceG), dos subunidades de la permeasa (YrbE4) y ocho proteínas adicionales de función actualmente desconocida (Mce4ABCDEFMas4AB), ninguna de las cuales pueden ser reemplazadas por subunidades homólogas presentes en los otros operones *mce* de *M. smegmatis* mc²155.
- La ATPasa MceG posee una extensión C-terminal no conservada en ATPasas ABC similares que podría estar implicada en la unión de proteínas adicionales a las presentes

en el operón *mce4* y necesarias para el correcto transporte activo de colesterol en *M. smegmatis* mc²155.

- *Mycobacterium smegmatis* posee un sistema de transporte pasivo de esteroides independiente de Mce4.
- Los sistemas Mce, incluyendo el sistema Mce4 cuya función ha sido relacionada hasta la fecha únicamente con el transporte de colesterol, podrían estar implicados en procesos de transporte de componentes lipídicos presentes en la envoltura celular de *M. smegmatis* mc²155 bajo situaciones de estrés. Este hecho sugiere que probablemente los compuestos esteroideos son capaces de utilizar el sistema Mce4 para transportarse al interior celular por su similitud estructural con algunos lípidos de la envoltura celular.
- *Corynebacterium glutamicum*, un microorganismo sin metabolismo endógeno de degradación de esteroides ha demostrado su potencial biotecnológico como chasis para la expresión de genes heterólogos útiles para la biotransformación de esteroides.

III. INTRODUCCIÓN

1. El colesterol y los compuestos esteroideos

1.1. Los esteroides y esterol

Los esteroides son compuestos orgánicos de gran interés biológico, medioambiental e industrial que se encuentran ampliamente distribuidos en la Naturaleza. Su estructura contiene un esqueleto de ciclopentanoperhidrofenantreno constituido por 17 carbonos que presenta 3 ciclohexanos (anillos A, B y C) y un ciclopentano (anillo D) (Fig. 1 A). Los derivados de esta estructura básica presentan multitud de modificaciones estructurales que consisten en la diferente saturación de los anillos, la presencia de grupos metilo en las posiciones C10 y C13, la presencia de un grupo hidroxilo o carbonilo en C3 y la presencia de una cadena alifática en la posición C17 (JCBN, 1989), lo cual origina una gran variabilidad de esteroides. La longitud de la cadena lateral, así como la presencia de diferentes grupos funcionales (en configuración α o β), determinan las características químicas y fisiológicas propias de cada esteroide.

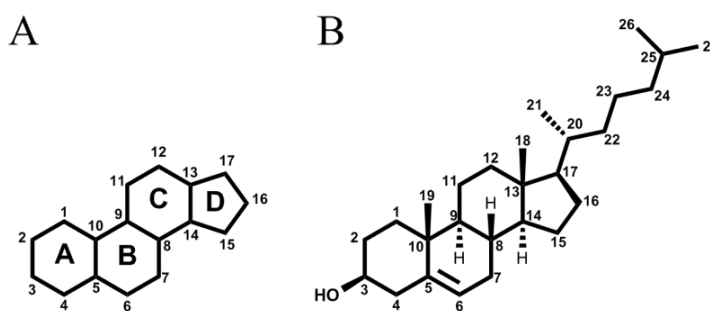


Figura 1. Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno (A) y del colesterol (B).

Los esterol

et al., 2002; Lamb *et al.*, 2007) y en *Gemmata obscuriglobus* (Pearson *et al.*, 2003), aunque la funcionalidad de estos esteroides sintetizados en bacterias todavía no se conoce. Sin embargo, los esteroides pueden ser degradados por algunas bacterias capaces de utilizarlos como fuente de carbono y energía para su crecimiento.

El colesterol (3-hidroxi-5,6-colesteno) (Fig. 1 B) es un esterol de 27 átomos de carbono en el que el grupo hidroxilo del C3 adopta una configuración β . Este alcohol policíclico es una de las moléculas más abundantes en la naturaleza, donde se encuentra formando parte de las membranas de las células animales (Slaytor *et al.*, 1965). Aunque es una molécula esencial para muchos animales, incluido el ser humano, los mamíferos no requieren el colesterol en la dieta ya que todas las células pueden sintetizarlo a partir de precursores simples. Debido a que los mamíferos carecen de las enzimas necesarias para degradar el núcleo del colesterol, el exceso de este se excreta con pequeñas modificaciones estructurales o bien transformado en otros compuestos esteroideos (ácidos biliares u hormonas esteroideas) (Björkhem *et al.*, 2001).

El colesterol tiene una gran importancia metabólica, ya que es el precursor inmediato de un gran número de compuestos tales como vitaminas, hormonas esteroideas y ácidos biliares (Miller, 1988; Björkhem *et al.*, 2001). Todas las hormonas esteroideas humanas derivan del colesterol. En la corteza de la glándula adrenal se sintetizan dos clases de hormonas esteroideas: los mineralocorticoides (aldosterona), que controlan la reabsorción de iones inorgánicos (Na^+ , Cl^- y HCO_3^-) por el riñón, y los glucocorticoides (cortisol), que afectan al metabolismo de proteínas y carbohidratos (participan en la regulación de la gluconeogénesis, por ejemplo) y reducen la respuesta inmune, la inflamación y las respuestas alérgicas. Las hormonas sexuales se producen en las gónadas masculinas y femeninas y en la placenta. Entre ellas se encuentran la progesterona, que regula el ciclo reproductivo femenino, y los andrógenos (como la testosterona) y estrógenos (como el estradiol), que influyen en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios masculinos y femeninos, respectivamente. Los ácidos y sales biliares son derivados hidrofílicos del colesterol que tienen un papel importante en la digestión, donde participan en la emulsión de las grasas de la dieta. Por último, la vitamina D también deriva de la molécula de colesterol. La vitamina D₃, también llamada colecalfiferol, se forma normalmente en la piel a partir del 7-dehidrocolesterol en una reacción fotoquímica catalizada por el componente ultravioleta de la luz solar. Posteriormente es convertida por enzimas en el hígado y los riñones a 1,25-dihidroxicolecalciferol, la hormona activa, que regula la absorción de calcio en el intestino y los niveles de calcio en riñones y huesos (Nelson *et al.*, 2008).

1.2. Importancia de los esteroides como contaminantes ambientales

En los últimos años y como consecuencia de la actividad humana incontrolada, se ha producido el vertido de numerosos compuestos contaminantes al medio ambiente procedentes no solo de actividades industriales sino también de los efluentes municipales, que son hoy en día una de las mayores fuentes de emisión de estos residuos. Estos vertidos aportan

hidrocarburos, pesticidas, surfactantes y distintos metales, pero también aportan esteroides y esteroides de origen natural y sintético. La presencia y/o acumulación en determinados nichos ecológicos de estas moléculas de naturaleza esteroidea puede causar efectos muy perjudiciales sobre la salud humana y alterar los ciclos biológicos de algunas especies animales que forman parte de estos ecosistemas.

Dentro de los compuestos esteroideos, el colesterol y especialmente algunos de sus derivados como los productos farmacéuticos y los denominados productos para el cuidado personal (PPCPs) se consideran hoy en día importantes contaminantes medioambientales de especial relevancia para los medios acuáticos (Gagné *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2011). Entre los productos de origen farmacéutico se encuentra el anticonceptivo sintético oral 17 α -etinilestradiol, considerado responsable, junto con los estrógenos 17 β -estradiol y estrona, de causar la producción de vitelogenina (feminización) en peces macho (Daughton *et al.*, 1999). Además, hay que señalar que el colesterol es el principal componente de la lanolina, y éste y otros esteroides relacionados son contaminantes naturales bastante resistentes al tratamiento anaeróbico que se lleva a cabo sobre los efluentes procedentes del lavado industrial de la lana (Poole *et al.*, 2004). Estos efluentes están expresamente reconocidos como altamente contaminantes por la legislación europea que regula el impacto ambiental de los residuos industriales (Directiva 85/377/CEE).

La cantidad de estrógenos procedentes de fuentes animales es de menor importancia que la procedente de aguas residuales, pero los residuos de estiércol contribuyen de manera importante a su entrada en el medio ambiente (Hanselman *et al.*, 2003; Raman *et al.*, 2004). El estiércol procedente de ganado y aves de corral es considerado una fuente de testosterona ambiental (Lee *et al.*, 2003).

1.3. Interés industrial y biotecnológico de los esteroides

Muchos de los compuestos derivados del colesterol poseen un gran valor como intermediarios en la síntesis de esteroides de interés farmacológico, tales como antiinflamatorios, diuréticos, anticonceptivos o inmunosupresores, entre otros. Por ello, la industria químico-farmacéutica les ha prestado gran atención durante las últimas décadas (Demain, 1992; Sedlacek *et al.*, 1988).

Debido a su estructura la síntesis química de los esteroides requiere de procesos muy complejos en los que intervienen múltiples pasos de reacción. Además, la quiralidad de la estructura de muchos de estos compuestos añade complejidad al diseño del proceso. Frente a estos inconvenientes, las biotransformaciones microbianas de los esteroides proporcionan una alternativa eficaz a la síntesis química, permitiendo la obtención de compuestos regio- y estereoselectivos. Desde que en 1952 se consiguió llevar a cabo la 11 α -hidroxilación de la

progesterona (precursor de la cortisona) empleando diferentes especies del género *Rhizopus* (Hogg, 1992), el uso de las biotransformaciones microbianas en los procesos de producción de medicamentos esteroideos y hormonas se han multiplicado (Mahato *et al.*, 1997). Aunque algunas de estas biotransformaciones están bien definidas, la mejora en el rendimiento de éstas y la identificación de nuevas reacciones que puedan ser potencialmente útiles son dos de los objetivos actuales de la industria de esteroides (Fernandes *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2007). El conocimiento de las bases genéticas y bioquímicas de las rutas catabólicas de esteroides y de sus mecanismos de regulación en bacterias puede aportar a la industria farmacéutica enzimas con nuevas propiedades susceptibles de ser producidas, modificadas y mejoradas mediante técnicas de ingeniería de proteínas.

Los fitoesteroles, entre los que se encuentran el estigmasterol, el β -sitosterol y el campesterol, son una de las materias primas más empleadas para las biotransformaciones. Los fitoesteroles se extraen habitualmente de la soja pero también se pueden obtener del pino o de los residuos de la industria papelera (Fernandes *et al.*, 2003; Malaviya *et al.*, 2008). El colesterol, es otro de los materiales de partida utilizados en las biotransformaciones de esteroides, y se obtiene a partir de las grasas y aceites animales, como la manteca de cerdo, el sebo vacuno, la grasa de la leche o el aceite de pescado (Fernandes *et al.*, 2003). Sin embargo, debido a los exhaustivos controles de calidad que deben realizarse sobre las materias primas de origen animal, los fitoesteroles de las plantas son a día de hoy los más empleados.

Muchos de los procesos de producción de esteroides parten de intermediarios de la ruta de degradación del colesterol y los fitoesteroles como la 4-androsten-3,17-diona (AD), 1,4-androsten-3,17-diona (ADD), 9-hidroxi-4-androsten-3,17-diona (9OH-AD), 11-hidroxi-4-androsten-3,17-diona (11OH-AD) y 11-hidroxi-1,4-androsten-3,17-diona (11OH-ADD). Puesto que estos cinco compuestos son en realidad considerados como sintonas de partida para la industria farmacéutica, los procesos de producción de estos compuestos a partir de fitosteroles constituye actualmente uno de los principales objetivos de la industria de esteroides (Fernandes *et al.*, 2010). Los esteroides que se producen mediante biotransformación en la actualidad son el cortisol (*Curvularia lunata*), la prednisolona (*Arthrobacter simplex*), 11 α -hidroxiprogesterona (*Rhizopus nigricans*), AD (*Mycobacterium* sp.) y 1-deshidrotestololactona (*Cylindrocarpus radiculicola*).

Además del interés para la industria farmacéutica, el estudio de los microorganismos capaces de degradar o transformar colesterol y otros esteroides ha permitido el desarrollo de biosensores de colesterol, de gran utilidad en el diagnóstico clínico (Arya *et al.*, 2008; Jubete *et al.*, 2009) y en la industria alimentaria (Jubete *et al.*, 2009), y ha permitido descubrir la capacidad de algunas bacterias probióticas como los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* o *Bifidobacterium* (Pereira *et al.*, 2002) para reducir los niveles de colesterol en sangre (Ooi *et al.*, 2010).

Por último hay que señalar que la caracterización de las rutas de degradación de esteroides en bacterias facilitará el empleo de procedimientos de ingeniería metabólica para la modificación, el control y/o la ampliación de las capacidades degradativas de diversas cepas bacterianas. Este conocimiento no solo permitirá la utilización de las bacterias como agentes biológicos descontaminantes sino que también ampliará el potencial biotecnológico de las diversas cepas en la producción industrial de compuestos esteroideos.

2. Degradación bacteriana de esteroides

2.1. Bacterias degradadoras de compuestos esteroideos

El colesterol es un compuesto relativamente resistente a la degradación microbiana debido principalmente al bajo número de grupos funcionales (un único doble enlace C-C y un sólo grupo hidroxilo), a su baja solubilidad en agua (3×10^{-8} M) y a la complejidad de su conformación espacial. La ubicuidad de colesterol y otros esteroides relacionados con él en el medio ambiente ha hecho que algunas bacterias de suelo hayan adquirido la capacidad de utilizar estos compuestos como fuente de carbono y energía (Söhngen, 1913). Como se ha comentado anteriormente, la búsqueda de microorganismos capaces de degradar colesterol y las rutas de degradación de estos compuestos en bacterias han sido un importante objeto de estudio en los últimos años, debido por un lado al interés de la industria farmacéutica en los procesos de bioproducción de fármacos esteroideos, y por otro debido a su importancia ecológica como contaminantes medioambientales.

En el año 1913 se describieron por primera vez algunas especies del género *Mycobacterium* que podían utilizar el colesterol como única fuente de carbono y energía (Söhngen, 1913). Años más tarde se comprobó que microorganismos pertenecientes al género *Proactinomyces* eran capaces de degradar parcialmente el colesterol añadido al medio de cultivo y que algunos de ellos, en particular *P. erythropolis*, posteriormente renombrado como *Rhodococcus erythropolis*, acumulaba ciertos compuestos estructuralmente relacionados con el colesterol, lo que ponía de manifiesto su capacidad para transformar esta molécula y su uso potencial para obtener nuevos derivados esteroídicos (Turfitt, 1944; Turfitt, 1948). Además se comprobó que ciertas especies de *Azotobacter* podían transformar el colesterol en 4-colesten-3-ona o en 7-dehidrocolesterol y que muchas de ellas hidrolizaban la cadena lateral generando metilheptenona que se acumulaba en el medio de cultivo (Horvath *et al.*, 1947). Whitmarsh (1964) demostró que ciertas especies de *Nocardia* aisladas del suelo eran capaces de hidrolizar la cadena lateral del colesterol transformando esta molécula en diferentes derivados esteroídicos, muchos de los cuales tenían características parecidas a ciertas hormonas sexuales. Otros autores pusieron de manifiesto que distintas bacterias pertenecientes a los géneros *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Serratia*, *Achromobacter*, *Pseudomonas* o *Protaminobacter*, entre otras, eran

capaces de degradar total o parcialmente el colesterol y otros esteroides (Tak, 1942; Brown *et al.*, 1966; Arima *et al.*, 1969; Nagasawa *et al.*, 1969; Chipley *et al.*, 1975; Martin, 1977a; Ferreira *et al.*, 1984), si bien hay que decir que muchas de estas cepas hoy en día se clasifican de diferente manera. Por ejemplo, dos de las cepas más ampliamente estudiadas, *Nocardia restrictus* ATCC 14887 y *Brevibacterium sterolicum* ATCC 21387, ahora están clasificadas como cepas de *Rhodococcus equi* (Goodfellow *et al.*, 1977; Ladrón *et al.*, 2003). Por otro lado, la cepa *Sterolibacterium denitrificans*, es a día de hoy la única bacteria Gram-negativa con capacidad de utilizar el colesterol como única fuente de carbono y energía en anaerobiosis (Tarlera *et al.*, 2003). A pesar de su gran relevancia industrial y medioambiental, las rutas metabólicas bacterianas que conllevan la transformación de los esteroides no se conocen aun completamente y la información de la que se dispone en la actualidad se centra principalmente en la degradación de la testosterona, de los ácidos biliares y del colesterol.

La degradación bacteriana de la testosterona ha sido estudiada en gran detalle desde la década de 1960 (Sih *et al.*, 1965; Sih *et al.*, 1968c) en la bacteria *Comamonas testosteroni*, anteriormente denominada *Pseudomonas testosteroni* (Tamaoka *et al.*, 1987). Muchas de las etapas de la ruta de degradación de la testosterona han sido caracterizadas a nivel genético y bioquímico en la cepa *Comamonas testosteroni* TA441 (Horinouchi *et al.*, 2001; Horinouchi *et al.*, 2003a; Horinouchi *et al.*, 2003b; Horinouchi *et al.*, 2004a; Horinouchi *et al.*, 2004b; Horinouchi *et al.*, 2005; Horinouchi *et al.*, 2010). Aunque muchos de los genes de la ruta de degradación de la testosterona, denominados genes *tes*, han sido caracterizados, existen aún algunas lagunas de conocimiento sobre la funcionalidad de algunos de ellos. Esta cepa, además de testosterona es capaz de utilizar también los ácidos biliares como fuente de carbono y energía, pero no el colesterol (Horinouchi *et al.*, 2008).

La degradación de ácidos biliares se ha estudiado principalmente en la cepa de *Pseudomonas* sp. Choll, que es capaz de crecer aeróbicamente y anaeróbicamente (utilizando el nitrato como aceptor final de electrones) empleando el ácido cólico y las sales biliares como única fuente de carbono y energía (Philipp *et al.*, 2006). La capacidad de crecer en ácido cólico como única fuente de carbono ha sido observada también en diversas especies de *Rhodococcus*, concretamente en las cepas *R. rhodochrous* DSM43269 (Petrusma *et al.*, 2011) y *R. jostii* RHA1 (Mohn *et al.*, 2012). El análisis transcriptómico de *R. jostii* RHA1 cultivada en ácido cólico reveló la inducción de 39 genes que no aparecían inducidos cuando la bacteria crecía en colesterol, los cuales se agrupan en un único *cluster* génico (Mohn *et al.*, 2012).

En general, los actinomicetos productores de ácidos micólicos, entre los que se incluyen los géneros *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella*, presentan la capacidad de metabolizar el colesterol y otros esteroides vegetales (Kreit *et al.*, 2009), siendo en los géneros *Rhodococcus* y *Mycobacterium* donde más se ha estudiado el metabolismo de este esteroide. Las especies del género *Rhodococcus*, pertenecientes a la familia *Nocardiaceae* del orden *Actinomycetales*, son capaces de utilizar una

amplia variedad de compuestos orgánicos y xenobióticos como fuente de carbono y energía, tales como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, compuestos clorados, nitrilos halogenados, compuestos heterocíclicos (Martínková *et al.*, 2009). La versatilidad metabólica de las cepas de *Rhodococcus* se refleja en sus genomas, que codifican numerosas vías catabólicas para una gran variedad de compuestos que posteriormente son canalizados hacia rutas catabólicas centrales. Con el objetivo de producir diversos esteroides bioactivos, que pueden ser utilizados como precursores en la síntesis de fármacos esteroideos, se han construido diversas cepas mutantes de *Rhodococcus* que tienen bloqueadas alguna de las etapas de la degradación de esteroides (Van der Geize *et al.*, 2000; Van der Geize *et al.*, 2002a; Van der Geize *et al.*, 2002b). Además, el estudio y caracterización en estas cepas de algunas de las enzimas involucradas en el catabolismo de esteroides ha permitido alcanzar un mayor grado de conocimiento sobre las diferentes etapas en la degradación del colesterol (Knol *et al.*, 2008; Petrusma *et al.*, 2009; Rosłonec *et al.*, 2009). El análisis transcriptómico de la cepa *Rhodococcus jostii* RHA1 cultivada en colesterol permitió la identificación de un *cluster* de 58 genes, de los cuales 51 se inducen en presencia de este esteroide (Van der Geize *et al.*, 2007). Estos 51 genes se encuentran conservados en *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* Calmette-Guérin (BCG) formando parte de un *cluster* de 82 genes, y también en *M. avium*, dentro de un *cluster* de 80 genes (Van der Geize *et al.*, 2007).

El género *Mycobacterium* es el único de la familia *Mycobacteriaceae*, del orden *Actinomycetales* e incluye patógenos que causan graves enfermedades en los mamíferos, como *M. tuberculosis*, *M. bovis* o *M. leprae*, y también saprófitos de vida libre, no patógenos u oportunistas, como *M. smegmatis*, *M. aurum*, *M. phlei* o *M. fortuitum*. Las micobacterias son bacterias aerobias con forma de bacilos rectos o ligeramente curvados que miden 0.2-0.6 μm de ancho por 1-10 μm de largo y poseen un contenido en G+C muy elevado (62-70%). Dada la importancia de la degradación del colesterol en la patogénesis de *M. tuberculosis*, en los últimos años se ha avanzado mucho en el estudio de su metabolismo en micobacterias. Debido a las dificultades experimentales que supone la manipulación de esta cepa patógena, un gran número de estudios se han realizado empleando la cepa no patógena *M. smegmatis*. Esta cepa fue la primera especie de micobacteria reconocida después de *M. tuberculosis* (Lehmann *et al.*, 1930). Aunque *M. smegmatis* fue aislada inicialmente de exudados de secreciones genitales (Alvarez *et al.*, 1885), actualmente se considera una micobacteria no patógena y un microorganismo ambiental ya que ha sido aislado del suelo y del agua (Tsukamura, 1976). Aunque la capacidad de *M. smegmatis* de degradar el colesterol fue descrita hacia mediados del siglo XX (Sobel *et al.*, 1974), ha sido en los últimos años, principalmente desde el descubrimiento de la implicación de la degradación del colesterol en los mecanismos de patogénesis de *M. tuberculosis* (Pandey y Sassetti, 2008), cuando se han llevado a cabo la mayoría de los estudios a nivel molecular destinados a la caracterización de algunas de las enzimas implicadas en la ruta de degradación de este esteroide en *M. smegmatis* así como de su regulación.

2.2. Degradación aeróbica del colesterol

Aunque el catabolismo bacteriano del colesterol no se ha dilucidado completamente en ninguna de las bacterias capaces de metabolizarlo, ha sido posible determinar la mayoría de las etapas bioquímicas de esta ruta de degradación a partir de la combinación de diferentes estudios realizados con varias cepas degradadoras de esteroides (Martin, 1977b; Owen *et al.*, 1983; Kieslich, 1985; Sedlacek *et al.*, 1988; Szentirmai, 1990; Griffin *et al.*, 2011; Ouellet *et al.*, 2011; García *et al.*, 2012). A continuación se exponen brevemente las diferentes etapas de esta ruta:

a) Transporte del colesterol. El *cluster* de genes del catabolismo del colesterol incluye un sistema de transporte de esteroides codificado por el denominado operón *mce4*, cuya función fue demostrada en *R. jostii* RHA1 (van der Geize *et al.*, 2007) y *M. tuberculosis* (Pandey y Sassetti, 2008). Puesto que el objeto de estudio de esta Tesis Doctoral se centra en el estudio del transporte de colesterol en la cepa *M. smegmatis* mc²155, los conocimientos de los que se disponía al inicio de la misma sobre el estudio de este operón se exponen en un apartado específico más adelante (apartado 4.2 de esta sección).

b) Transformación del colesterol en 4-colesten-3-ona. Está comúnmente aceptado que el primer paso en la ruta aeróbica de degradación del colesterol, simultáneo a la degradación de la cadena lateral, consiste en la oxidación de éste a través de dos reacciones secuenciales: la oxidación de colesterol a 5-colesten-3-ona seguida de su isomerización a 4-colesten-3-ona (a partir de ahora denominada como colesteno). Este paso enzimático está mediado en algunos microorganismos por una colesterol oxidasa (ChOx) (Li *et al.*, 1993; Yue *et al.*, 1999; Coulombe *et al.*, 2001; Navas *et al.*, 2001; Lario *et al.*, 2003; Brzostek *et al.*, 2007; Drzyzga *et al.*, 2011; Fernández de las Heras *et al.*, 2011), mientras que en otros se trata de una 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa (3 β -HSD) (Horinouchi *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 2007; Uhía *et al.*, 2011b; Yang *et al.*, 2011). En ambos casos se trata de enzimas bifuncionales que incluyen actividad 3 β -hidroxiesteroide oxidasa o deshidrogenasa y actividad Δ 5-3-cetoesteroide isomerasa (Fig. 2). En las bacterias del género *Mycobacterium* se ha demostrado que este paso está mediado por una 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Las enzimas 3 β -hidroxi- Δ 5-esteroide HSD pertenecen a la familia de enzimas que catalizan la conversión de esteroides 3 β -hidroxi-5-ene en esteroides 3-oxo-4-ene a través de reacciones consecutivas de oxidación e isomerización usando NAD o NADP como cofactores. El análisis de las bases de datos reveló la existencia de una superfamilia de proteínas que además de las HSDs bacterianas incluyen las 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas de mamíferos, las UDP-galactosa-4-epimerasas bacterianas y las 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas víricas (Baker y Blasco, 1992). Sin embargo, los genes *MSMEG_5228* y *MSMEG_5233*, que codifican 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas/isomerasas son las responsables de la transformación del colesterol en colesteno en esta cepa. Aunque la implicación de estas enzimas en la degradación del colesterol ha sido demostrada, la inactivación simultánea de ambas no impide el

crecimiento de esta cepa en colesterol como única fuente de carbono, lo que puso de manifiesto la existencia de otra enzima capaz de llevar a cabo dicha etapa catabólica que aún no ha sido determinada (Uhía *et al.*, 2011b; Brzostek *et al.*, 2013).

b) Oxidación de la cadena lateral del colesterol. De forma simultánea o posteriormente a la oxidación del colesterol a colesteno tiene lugar la oxidación de la cadena alifática del colesterol (Fig. 2). Las primeras etapas de este proceso han sido estudiadas en *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* y *R. jostii* RHA1, y consisten en tres oxidaciones secuenciales del C26 realizadas por los citocromos P450 CYP125 y CYP142 (Capyk *et al.*, 2009a; McLean *et al.*, 2009; Rosłonec *et al.*, 2009; Driscoll *et al.*, 2010; Johnston *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2010a; García-Fernández *et al.*, 2013) dando lugar a la producción del ácido 4-colesten-3-ona-26-oico (ácido 3-oxo-colestenoico, 3OChA). Después de la formación del ácido se asume que la cadena lateral es metabolizada mediante un proceso similar al de la β -oxidación de los ácidos grasos, y aunque muchas de las enzimas implicadas son desconocidas, recientemente se están identificando algunas enzimas que podrían intervenir en este proceso. (Wilbrink *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2013; Nesbitt *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015).

c) Rutas central y baja de degradación del colesterol. Una vez que la cadena alifática se ha oxidado, el metabolismo del colesterol parece seguir para la mayoría de bacterias aeróbicas una ruta catabólica común para esteroides de 19 átomos de carbono (Fig. 2). En primer lugar, una 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa de baja especificidad, como KsdD en *M. smegmatis* (Brzostek *et al.*, 2005) o KstD en *Rhodococcus erythropolis* (Van der Geize *et al.*, 2000; Van der Geize *et al.*, 2001; Van der Geize *et al.*, 2002a) transforman el compuesto AD en 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD). Posteriormente tiene lugar una 9 α -hidroxilación catalizada por KstH en *M. smegmatis* (Andor *et al.*, 2006) y KshAB en *R. erythropolis* (Van der Geize *et al.*, 2002b; Van der Geize *et al.*, 2008) y en *M. tuberculosis* (Capyk *et al.*, 2009b), seguida de la transformación no enzimática de la 9 α -hidroxi-1,4-androstadien-3,17-diona (9OH-ADD) en 3-hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona (3-HSA). La hidroxilación subsecuente de 3-HSA por enzimas como la HsaAB en *R. jostii* RHA1 y *M. tuberculosis* (Dresen *et al.*, 2010) conduce a la obtención de la 3,4-dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona (3,4-DHSA), un derivado catecólico cuyo anillo A se abre por una extradiol dioxigenasa de tipo meta (TesB en *C. testosteroni* (Horinouchi *et al.*, 2001); HsaC en *R. jostii* RHA1 (Van der Geize *et al.*, 2007) y en *M. tuberculosis* (Yam *et al.*, 2009)) originando el ácido 4,5,9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-dien-4-oico (4,9-DSHA). Este compuesto es hidrolizado por HsaD en *M. tuberculosis* (Lack *et al.*, 2008; Lack *et al.*, 2010) o *R. jostii* RHA1 (Van der Geize *et al.*, 2007) originando los ácidos 2-hidroxi-2,4-hexadienoico y 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostan-5-oico (HIP). El ácido 2-hidroxi-2,4-hexadienoico es probablemente metabolizado por las enzimas HsaE, HsaF y HsaG originando ácido pirúvico y propionil-CoA, metabolitos que entrarían en las rutas centrales de degradación (Kieslich, 1985).

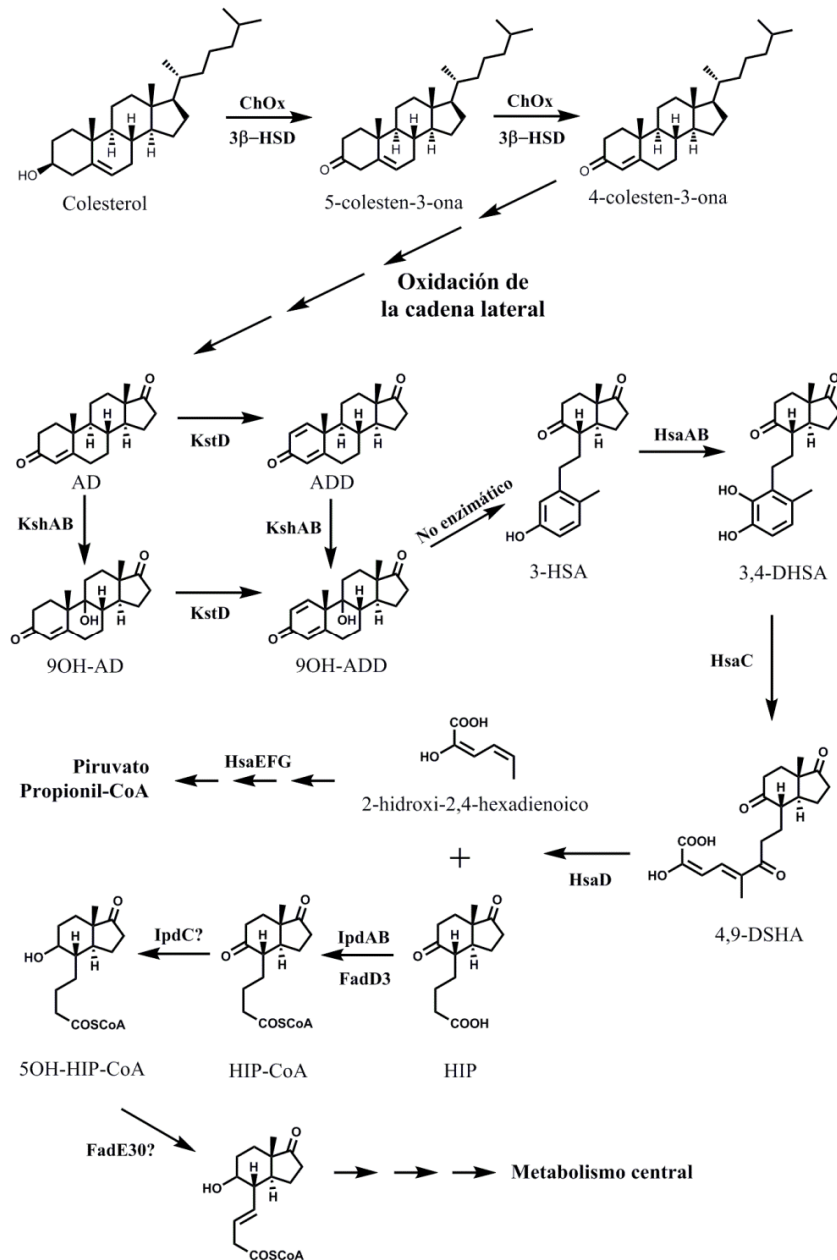


Figura 2. Ruta propuesta de la degradación del sistema de anillos del colesterol en bacterias aeróbicas. Las flechas consecutivas indican un proceso multienzimático. AD: 4-androsten-3,17-diona; ADD: 1,4-androstadien-3,17-diona; 9OH-AD: 9-hidroxi-4-androsten-3,17-diona; 9OH-ADD: 9-hidroxi-4-androstadien-3,17-diona; 3-HSA: 3-hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona; 3,4-DHSA: 3,4-dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona; 4,9-DSHA: 4,5,9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-dien-4-oico; HIP: ácido 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostan-5-oico; HIP-CoA: derivado CoA del HIP; derivado hidroxilado del HIP-CoA; ChOx: colesterol oxidasa; 3β-HSD: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; KstD: 3-cetoesteroide-Δ¹-deshidrogenasa; KshAB: 3-cetoesteroide-9α-hidroxilasa; HsaAB: 3-hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona 4 hidroxilasa; HsaC: 3,4-dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona dioxigenasa; HsaD: ácido 4,5,9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-dien-4-oico hidroxilasa; HsaE: 2-hidroxipentadionato hidratasa; HsaF: 4-hidroxi-2-cetovalerato aldolasa; HsaG: acetaldehído deshidrogenasa; IpdAB y FadD3: HIP-CoA transferasa.

Aunque estas enzimas no han sido aún caracterizadas, presentan una elevada similitud con las proteínas TesE, TesG y TesF de *C. testosteroni* que catalizan las mismas actividades en la ruta de degradación de la testosterona (Horinouchi *et al.*, 2005). Por otra parte, el metabolismo del HIP comenzaría con la degradación de su cadena lateral mediante un proceso similar a la β -oxidación (Lee *et al.*, 1967; Miclo *et al.*, 1990; Miclo *et al.*, 1992). El primer paso bioquímico consistiría en una activación de HIP con CoA, que aunque inicialmente fue atribuido en *R. erythropolis* a una CoA-transferasa de dos componentes, IpdAB, (Van der Geize *et al.*, 2011), recientemente ha sido descrita en *R. jostii* RHA1 la enzima FadD3 como la acil-CoA sintetasa responsable de dicha reacción (Casabon *et al.*, 2013a). A continuación actuaría una HIP-CoA reductasa que transformaría el grupo ceto del carbono C5 en un hidroxilo. El derivado hidroxilado sería sustrato de la acil-CoA deshidrogenasa FadE30 que iniciaría el ciclo de β -oxidación (Van der Geize *et al.*, 2011). El resto de las etapas de degradación de los anillos C y D, que llevarían a la producción de metabolitos centrales, no han sido descritas hasta la fecha.

2.3. Regulación de la expresión de los genes del metabolismo del colesterol

En la actualidad se conoce la existencia de dos reguladores transcripcionales encargados de reprimir la expresión de los genes de la ruta de degradación del colesterol que han sido descritos tanto en *M. smegmatis* como en *R. jostii* RHA1: KstR y KstR2, ambos pertenecientes a la familia de reguladores transcripcionales TetR (Kendall *et al.*, 2010). El represor KstR controla la expresión de 83 genes en *M. smegmatis* y 74 genes en *M. tuberculosis* relacionados con el metabolismo del colesterol, concretamente en la parte ruta alta y central de la ruta (Kendall *et al.*, 2007) y su secuencia operadora se ha determinado mediante estudios de las regiones promotoras de los genes a los que regula. Se trata de la secuencia palindrómica TnnAACnnGTTnnA, que también se localiza en la región promotora del propio KstR (Uhía *et al.*, 2011a). Por su parte, el represor KstR2 controla la expresión de 15 genes relacionados con la parte baja de la ruta tanto en *M. smegmatis* como en *M. tuberculosis* y su secuencia operadora también ha sido identificada (AAnCAAGnnCTTGnTT) (Kendall *et al.*, 2010; García-Fernández *et al.*, 2015). Estudios recientes, demostraron por primera vez que el compuesto 3OChA (ácido 4-colesten-3-ona-26-oico o ácido 3-oxo-colestenoico), un compuesto intermedio de la degradación de la cadena lateral del colesterol producido por los citocromos CYP125 y CYP142, funciona como efector del represor KstR permitiendo la expresión de los genes implicados en el metabolismo del colesterol (García-Fernández *et al.*, 2014). En cuanto al represor KstR2, se ha descrito que los genes que regula se inducen por el compuesto HIP-CoA (3 α -H-4 α (3'-propanoil-CoA)-7 $\alpha\beta$ -metilhexahidro-1,5-indanedi-ona) producido tras la acción de la ligasa FadD3 (Casabon *et al.*, 2013). Sin embargo, estudios recientes sugieren que otros derivados de la ruta como el 5OH-HIP-CoA (3 α -H-4 α (3'-ácido propanoico)-5 α -hidroxi-7 $\alpha\beta$ -metilhexahidro-1-indanona) o un derivado posterior de la ruta también pueden actuar como inductores de este regulador (García-Fernández *et al.*, 2015).

3. Transporte de lípidos y moléculas esteroideas en bacterias

3.1. Transporte en bacterias Gram-negativas

Los sistemas de transporte de esteroides en bacterias Gram-negativas (principalmente proteobacterias) son aún muy poco conocidos. La presencia de una membrana externa adicional y la amplia capa de lipopolisacáridos características de este tipo de bacterias impiden la difusión pasiva de esteroides (Plésiat *et al.*, 1992). Además, la falta de ATP en el espacio periplásmico (Wülfing *et al.*, 1994) excluye en principio la posibilidad de encontrar un transportador ABC en la membrana externa de las proteobacterias.

No ha sido hasta las últimas dos décadas cuando se ha comenzado a entender cómo las moléculas hidrofóbicas más grandes son capaces de atravesar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (Wiener *et al.*, 2011; Abumrad *et al.*, 1998). Los canales habituales de difusión como las porinas no permiten el paso de moléculas hidrofóbicas, por lo que son necesarios transportadores específicos para llevar a cabo el transporte de estas moléculas. Los estudios más recientes han permitido descubrir que estos transportadores pertenecen en su mayoría a los denominados canales de la familia FadL, que actúan a través de mecanismos de difusión lateral. En *E. coli*, donde estos canales han sido más ampliamente descritos, el sistema FadL lleva a cabo el transporte de ácidos grasos a través de la membrana externa de manera independiente de energía. Este proceso implica cambios conformacionales que finalmente provocan el transporte de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) al periplasma (van den Berg, 2005).

Uno de los pocos trabajos disponibles en lo referente al transporte de esteroides en bacterias Gram-negativas fue llevado a cabo por Mallonee y Hylemon (1996), quienes identificaron y caracterizaron un gen implicado en el transporte de ácidos biliares en *Eubacterium* sp. Cepa VPI 12708. Este gen, denominado *baiG*, codifica una proteína que presenta homología con diversas proteínas de membrana y forma parte de un operón implicado en la ruta de 7 α -deshidroxilación de los ácidos biliares. La confirmación de la función de este gen se produjo cuando su clonaje en *E. coli* permitió observar transporte activo de ácidos biliares de manera dependiente de energía al interior de la bacteria (Mallonee y Hylemon, 1996).

S. denitrificans es hasta la fecha el único organismo Gram-negativo que se ha descrito es capaz de metabolizar colesterol. En un trabajo reciente se ha demostrado que el sistema de transporte de colesterol en esta bacteria, que postulan es similar a los transportadores de tipo FadL, es capaz de transportar de manera específica diferentes esteroides C27 al periplasma. Una vez en el espacio periplásmico, el colesterol sería transformado en ácido colest-4-en-3-ona-26-oico, y posteriormente transportado hacia el citoplasma, donde se produciría la degradación de la cadena lateral y de los anillos (Lin *et al.*, 2015). Aunque este transportador constituiría el

único ejemplo de sistemas de transporte de colesterol en bacterias Gram-negativas, el gen o conjunto de genes responsables de esta función no han sido identificados todavía.

3.2. Transporte en bacterias Gram-positivas

La primera identificación de un transportador de ácidos grasos en una bacteria Gram-positiva fue descrita por Banchio y Gramajo (1997). En este trabajo, los autores demuestran que *Streptomyces coelicolor* es capaz de utilizar ácidos grasos exógenos con una cadena lateral de entre 4 y 18 carbonos como única fuente de carbono y energía. Aunque no se identificó el transportador, se observó que el transporte de ácidos grasos de cadena media como el octanoato ocurría por difusión pasiva mientras que el transporte de palmitato, un ácido graso de cadena larga, tenía lugar a través de procesos tanto de difusión pasiva como de transporte activo (Banchio y Gramajo, 1997). Recientemente, ha sido publicado un transportador ABC en *R. jostii* RHA1, que media la importación de LCFA (ácidos grasos de cadena larga) proporcionando ácidos grasos a las enzimas aciltransferasas implicadas en la síntesis de TAG y otras rutas lipídicas. Esta proteína transportadora, se encuentra presente únicamente en *Rhodococcus oleaginosus* y se cree que modula la distribución de ácidos grasos entre las diferentes rutas metabólicas (Villalba *et al.*, 2014).

El conocimiento acerca del transporte de moléculas esteroideas en bacterias Gram-positivas es algo menos limitado y se centra en las actinobacterias. El análisis de expresión génica de *R. jostii* RHA1 cultivado en colato mostró la inducción de dos transportadores denominados *camABCD* y *camM* (Mohn *et al.*, 2012). Un estudio posterior mostró que estos dos sistemas constituían bombas de importación de intermediarios tóxicos de la ruta de degradación del colato que se acaban reasimilando por la bacteria para finalizar la conversión del sustrato (Swain *et al.*, 2012). Posteriormente, se describió que el transporte de colato en *R. jostii* se atribuye en su mayor parte a la porina RjpA ya que un mutante en este gen presenta un marcado retraso en crecimiento en colato pero sigue siendo capaz de alcanzar niveles de crecimiento similares a los de la cepa silvestre. Se ha descrito que este efecto se debe a que aunque esta proteína juega un papel principal en el transporte de este esteroide, el resto de porinas presentes en el organismo aumentan su expresión para compensar la pérdida de función de RjpA (Somalinga y Mohn, 2013).

Pandey y Sassetti (2008) demostraron que el sistema Mce4, un complejo transportador similar a los sistemas ABC, constituía el principal mecanismo de transporte de colesterol en *M. tuberculosis* permitiendo al patógeno disponer de una fuente de carbono alternativa durante el proceso de infección. La caracterización posterior del operón *mce4* en *R. jostii* RHA1 (Mohn *et al.*, 2008) corroboró la función de este sistema confirmando el descubrimiento del primer transportador de lípidos complejos en Actinobacterias. El conocimiento existente acerca de este sistema de transporte así como de la familia de transportadores Mce a la que pertenece, se describen detalladamente en los apartados 4 y 5 de la Introducción.

Pese al descubrimiento del operón *mce4*, los mecanismos de transporte activo de colesterol en bacterias todavía no se conocen en detalle y en la actualidad está siendo un importante objeto de estudio, no solo por su recién descubierta implicación en la patogénesis de *M. tuberculosis* sino también por la amplia gama de aplicaciones industriales que permitiría su conocimiento. Debido por tanto a la importancia e interés en este proceso, el objeto de esta Tesis Doctoral se centra en el estudio y caracterización del transporte de colesterol en la cepa *M. smegmatis* mc²155 (Snapper *et al.*, 1990). Se trata de una bacteria de crecimiento rápido en medios ricos y medios sintéticos simples, que se ha desarrollado y utilizado como cepa modelo para el estudio de las micobacterias por su alta eficacia de transformación. Su velocidad de crecimiento en colesterol, en donde llega a fase estacionaria aproximadamente en 72 h (Uhía, 2010) y el hecho de que su genoma haya sido secuenciado (TIGR) la convierten en candidata para el estudio de la ruta de degradación de este esteroide. Además de crecer en colesterol, también es capaz de utilizar el primer intermediario derivado de éste, la colestenoína, como fuente de carbono y energía. Sin embargo, no es capaz de degradar otros esteroides, tales como pregnenolona, testosterona, progesterona o β -estradiol (Uhía, 2010). Puesto que el objeto de estudio de esta Tesis Doctoral se centra en el estudio del transporte de colesterol en la cepa *M. smegmatis* mc²155, los conocimientos de los que se disponía al inicio de la misma sobre el transporte en micobacterias y el estudio específico de este proceso se exponen detalladamente en los siguientes apartados.

3.3. Transporte en micobacterias

Como ya se ha comentado, en bacterias Gram-negativas los sustratos hidrofílicos pequeños son capaces de difundir a través de proteínas de membrana externa (OMPs) como FadL, sin embargo, las OMPs son difíciles de identificar en micobacterias (Nierderweis *et al.*, 2010) y ninguna de ellas se ha relacionado directamente con el transporte de lípidos. En *M. smegmatis* se ha identificado la OMP MspA, que es de hecho la proteína más abundante del organismo y se cree constituye la ruta más importante de difusión en la bacteria ya que está implicada principalmente en el transporte de sustratos hidrofílicos como la glucosa (Stahl *et al.*, 2001) y los fosfatos (Wolschendorf *et al.*, 2007) además de constituir también el principal canal para antibióticos hidrofílicos como las fluoroquinolonas y el cloranfenicol (Danilchanka *et al.*, 2008). Sorprendentemente, la delección del gen *mspA* en *M. smegmatis* causa un elevado aumento en la resistencia a antibióticos hidrofóbicos como la rifampicina y la eritromicina además de una reducción notable en el transporte del esteroide quenodesoxicolato, sin embargo, se cree que este efecto es debido a una menor permeabilidad causada por la reorganización de la membrana en el mutante y no a una implicación de la proteína MspA en el transporte de moléculas hidrofóbicas (Stephan *et al.*, 2004). También existen estudios que han identificado *in silico* genes homólogos a proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATPs) humanas en *M. tuberculosis*, sin embargo, su función no ha sido validada experimentalmente (Hirsch *et al.*, 1998).

La impermeabilidad a compuestos hidrofóbicos se ha conocido en parte gracias al uso de técnicas como la calorimetría diferencial de barrido que han permitido determinar las temperaturas de transición de los lípidos de la pared celular micobacteriana (Liu *et al.*, 1995). En este estudio se observó que las paredes celulares micobacterianas poseen temperaturas de fusión inusualmente elevadas y por tanto una fluidez muy baja a temperaturas fisiológicas, lo que sugiere que probablemente sean impermeables incluso a compuestos hidrofóbicos como los ácidos grasos. Por ello, la difusión pasiva de nutrientes hidrofóbicos como el colesterol tendría lugar de manera muy lenta y probablemente demasiado ineficaz como para permitir el crecimiento bacteriano. Además, se sabe que la tasa de difusión en micobacterias a través de porinas es extremadamente baja para solutos hidrofóbicos (Nikaido, 2003), por lo que las micobacterias deben utilizar transportadores específicos para el transporte de dichos compuestos. Esta falta de permeabilidad se debe en gran parte a la compleja pared celular de las micobacterias, cuya particular estructura y composición rica en lípidos supone una barrera para gran número de compuestos.

3.3.1. La pared celular micobacteriana

Las micobacterias poseen una inusual y característica pared celular que constituye una barrera impermeable para numerosas moléculas incluyendo gran número de antibióticos (Brennan y Nikaido, 1995). Esta pared celular también proporciona una protección física que ayuda a las especies patógenas a sobrevivir en el complicado ambiente existente en el interior de los macrófagos infectados (Wang *et al.*, 2000). Las rutas biosintéticas de la pared celular han sido por tanto dianas para la creación de drogas anti-micobacterianas durante muchos años, por lo que el conocimiento sobre la estructura y la biosíntesis de la pared celular micobacteriana se ha convertido en un objetivo principal no solo para obtener nuevas pistas útiles en el desarrollo de nuevos anti-micobacterianos sino también para mejorar el conocimiento de las interacciones micobacterianas con las células del huésped.

Los componentes estructurales de la pared celular de las micobacterias se encuentran formando diversas capas, lo que llevó a algunos autores a postular que la pared celular estaba compuesta por una bicapa lipídica asimétrica (Minnikin, 1982). Estudios posteriores de las paredes celulares micobacterianas mediante tomografía crioelectrónica (CET) han puesto de manifiesto que estas capas se organizan creando una membrana externa y un espacio similar al periplasma, por lo que a pesar de la clasificación filogenética de las micobacterias como Gram-positivas, su pared celular posee similitudes con las bacterias Gram-negativas (Hoffman *et al.*, 2008, Zuber *et al.*, 2008). En general, el modelo actual aceptado propone que la pared celular micobacteriana está compuesta por tres estructuras principales: la membrana plasmática o interna, el núcleo de la pared celular y la capa externa (Fig. 3).

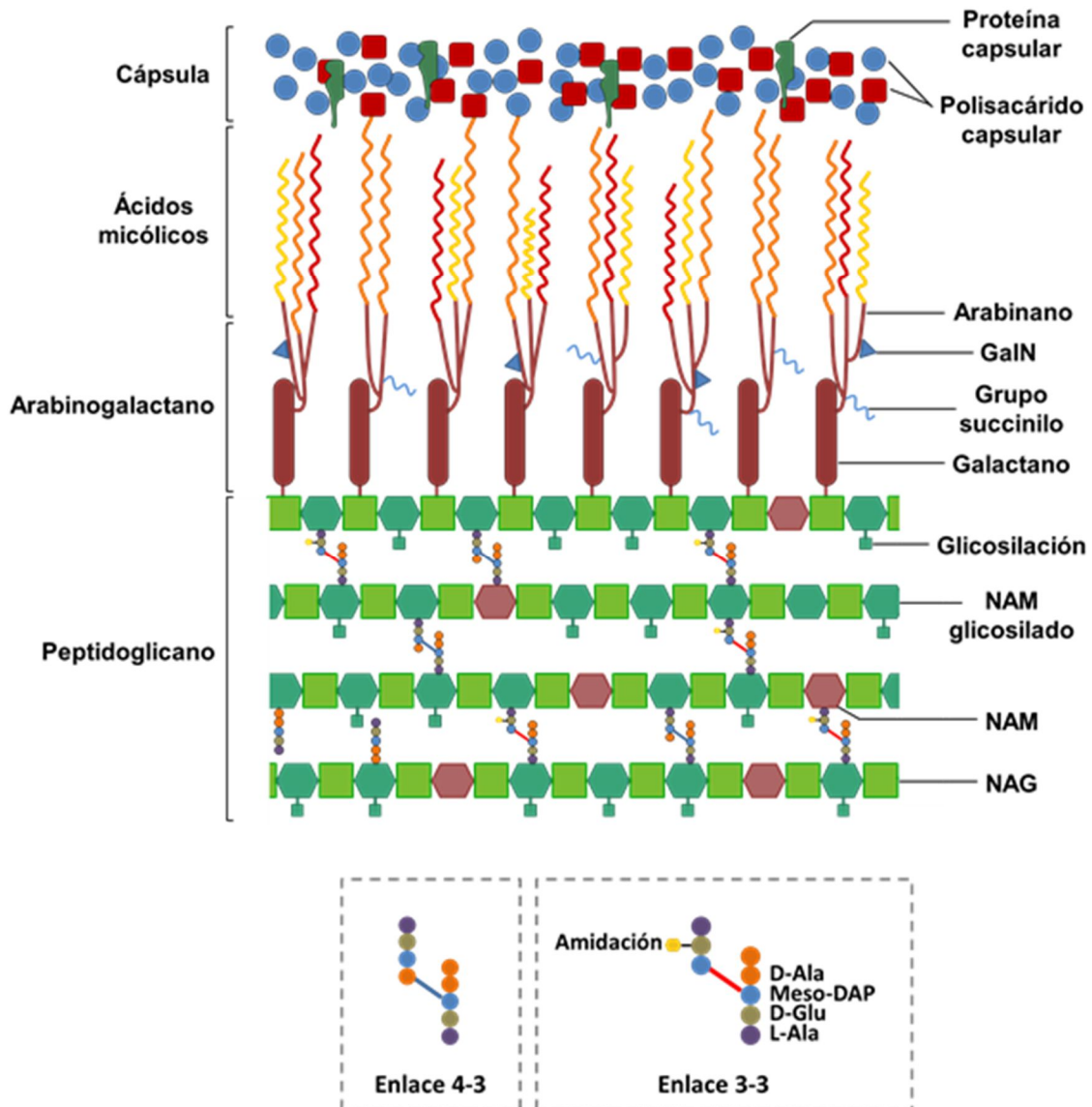


Figura 3. Esquema de la pared celular micobacteriana. Se muestran las tres macromoléculas principales de las que está compuesta, el peptidoglicano, el arabinogalactano y los ácidos micólicos, que se encuentran a su vez rodeadas por una cápsula formada por proteínas y polisacáridos. La capa de peptidoglicano rodea la membrana plasmática y está compuesta por largos polímeros repetidos del disacárido N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico (NAG-NAM) que se unen fuertemente a través de enlaces peptídicos no convencionales (enlaces 3-3). La capa de arabinogalactano rodea el peptidoglicano. El galactano está formado por una unidad disacárido repetida de 6-d-Gal β 1-5-d-Gal β y se encuentra modificado por largos polímeros de arabinano y en ocasiones por residuos de N-acetil galactosamina (GalN). La mayoría del arabinano se encuentra ligado a las largas cadenas alifáticas de los ácidos micólicos, componentes que dan lugar a una gruesa cubierta lipídica característica de las micobacterias y que son los principales responsables de la impermeabilidad de la pared celular. La membrana externa o cápsula está compuesta de una variedad de (glico)lípidos, polisacáridos, lipoglicanos y proteínas no unidos covalentemente, cuya composición y proporción varía entre las diferentes especies.

3.3.1.1. Membrana plasmática o interna

Como en otras bacterias, la membrana plasmática de *Mycobacterium*, cumple principalmente la función de protección osmótica y de transporte de iones y moléculas. Su estructura está constituida por una bicapa lipídica a la que están asociadas proteínas y algunos lipopolisacáridos distintivos como el lipoarabinomanano (LAM) y lipomanano (LM). También están asociados a su estructura fosfolípidos como fosfatidilinositolmanósidos (PIM), fosfatidilglicerol, cardiolipinas y fosfatidiletanolaminas (PE) (Besra *et al.*, 1997).

Uno de los componentes mayoritarios es el LAM, un importante lipopolisacárido de la envoltura que se encuentra presente en todas las especies de micobacterias. Está compuesto por un grupo fosfatidilinositol (PI) anclado a la membrana plasmática y unido de forma covalente a residuos de arabinosa y manosa. La estructura del componente polisacárido consta de una cadena principal de subunidades D-Man_p unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$, a la cual se unen residuos D-Man_p por enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$ y residuos D-Araf unidos a su vez por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ (Azuma *et al.*, 1968). Además de por manosa y arabinosa, también está compuesto por glicerol, inositol, fosfato, lactato, succinato, palmitato y tuberculoestearato (Hunter *et al.*, 1986). Los extremos de LAM en las especies patógenas y de crecimiento lento (*M. tuberculosis* y *M. bovis*) generalmente contienen residuos de manosa (ManLAM), a diferencia de los de las especies de crecimiento rápido (*M. smegmatis*) que terminan en residuos de PI (AraLAM) (Daffé y Draper, 1998). Los lipomananos (LMs) y lipoarabinomananos (LAMs) son lipoglicanos complejos cuya función es la de promover la supervivencia de las micobacterias interactuando con diferentes células del huésped, regulando la producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, inhibiendo la actividad microbicida de los macrófagos e impidiendo la proliferación de los linfocitos T.

Los segundos componentes mayoritarios son los fosfolípidos (PLs), que se encuentran asociados a la membrana celular de las bacterias. Los PLs de las micobacterias están constituidos casi exclusivamente por fosfodiacylglicerol derivados del ácido fosfatídico, tales como: fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina (PE) y manósidos del PI (PIM). Los PIM son fosfolípidos que intervienen activamente en la interacción entre la micobacteria y la célula huésped ya que actúan como adhesinas permitiendo la unión al macrófago por medio de receptores de manosa y facilitando así su fagocitosis (Vergne y Daffé, 1998). La estructura de los PIM está constituida fundamentalmente por glicerol fosfato unido en la posición L-1 a un anillo de inositol, al cual también están unidos glicosídicamente dos residuos de manosa en las posiciones 2 y 6. Los mono-PIM y diacyl-fosfatidilinositol dimanósidos (PIM₂) son mayoritarios en corinebacterias y nocardias, mientras que los penta-PIM₅ y exa-PIM₆ son característicos de las micobacterias (Lee *et al.*, 1965).

3.3.1.2. Complejo mAGP (micolil-arabinogalactan-peptidoglicano)

El núcleo de la pared celular está formado por glico-conjugados de peptidoglicano (PG) y arabinogalactano (AG) unidos covalentemente mediante enlaces fosforil-N-acetilglucosamilo-ramnosil (Nierderweis *et al.*, 2010). Los ácidos micólicos (AM) de cadena larga (hasta 90 carbonos de longitud) se esterifican al AG y constituyen uno de los componentes dominantes de la membrana externa, formando el 30%-40% de la masa de la envoltura celular (Brennan 2003, Nierderweis *et al.*, 2010). El complejo entero, que comprende el PG y el AG esterificados con ácidos micólicos, se conoce con el nombre de complejo micolil-arabinogalactan-peptidoglicano (mAGP).

El peptidoglicano (PG) de *Mycobacterium* presenta dos diferencias en comparación al de otras bacterias: los residuos de ácido murámico están N-glicosilados con ácidos glicólicos en lugar de residuos acetilo, y las uniones peptídicas entre cadenas son entre dos residuos de ácido diaminopimélico además de ácido diaminopimélico y D-alanina. El arabinogalactano (AG) en la mayoría de las micobacterias representa aproximadamente el 35% de su pared celular (Draper, 1982) y está también presente en otras bacterias relacionadas como corinebacterias, rodococos y nocardias. El AG está compuesto exclusivamente de D-galactofuranosas y D-arabinofuranosas, azúcares poco frecuentes en la naturaleza (Chatterjee, 1997).

Los ácidos micólicos (AMs) son ácidos grasos α -ramificados y β -hidroxilados de alto peso molecular que poseen una estructura general $R_1\text{-CH(OH)-CH(R}_2\text{)-COOH}$ donde R_1 es una cadena de meromicolato con 50-56 carbonos y R_2 es una ramificación en α con 22-26 carbonos (Fig. 4 A). Los ácidos micólicos son uno de los componentes principales y característicos de la pared celular de las actinobacterias y se pueden encontrar unidos al AG o a componentes de otros lípidos formando trehalosa monomicolatos (TMM), dimicolatos (TDM) y glucosa monomicolatos (GMM). Constituyen el núcleo de la pared celular micobacteriana y forman una barrera efectiva para la penetración de antibióticos y agentes quimioterapéuticos (Brennan *et al.*, 1995).

Basándose en su variabilidad estructural y complejidad, los ácidos micólicos son específicos de género y especie y como consecuencia, se han usado durante años como marcadores taxonómicos. Así, los ácidos micólicos contienen de 22-38 átomos de carbono en las especies de *Corynebacterium*, entre 30-36 en *Hoyosella* y *Amycolicococcus*, 34-38 en *Dietzia*, 34-52 en *Rhodococcus*, 46-60 en *Nocardia*, 46-66 en *Gordonia*, 64-78 en *Tsukamurella*, 60-90 en *Mycobacterium*, y hasta 100 en *Segniliparus*.

Los ácidos micólicos de las micobacterias muestran una gran diversidad de longitud de cadena y funciones químicas que definen las diferentes clases de AMs, llevando a producir patrones complejos cuando se analizan mediante TLC (Barry *et al.*, 1998; Daffé *et al.*, 1983). Se conocen dos familias de ácidos micólicos, los más apolares son los denominados α -micólicos, que forman parte de la familia de ácidos micólicos que no posee ningún grupo funcional

oxigenado. Contienen entre 74 y 80 átomos de carbono y generalmente dos dobles enlaces (en configuración *cis*- o *trans*-) o dos grupos *cis*-ciclopropil localizados en la cadena de meromicolato. Los ácidos micólicos con 60-62 átomos de carbono, conocidos como los α' -micólicos, contienen un solo doble enlace en *cis* (Fig. 4 B).

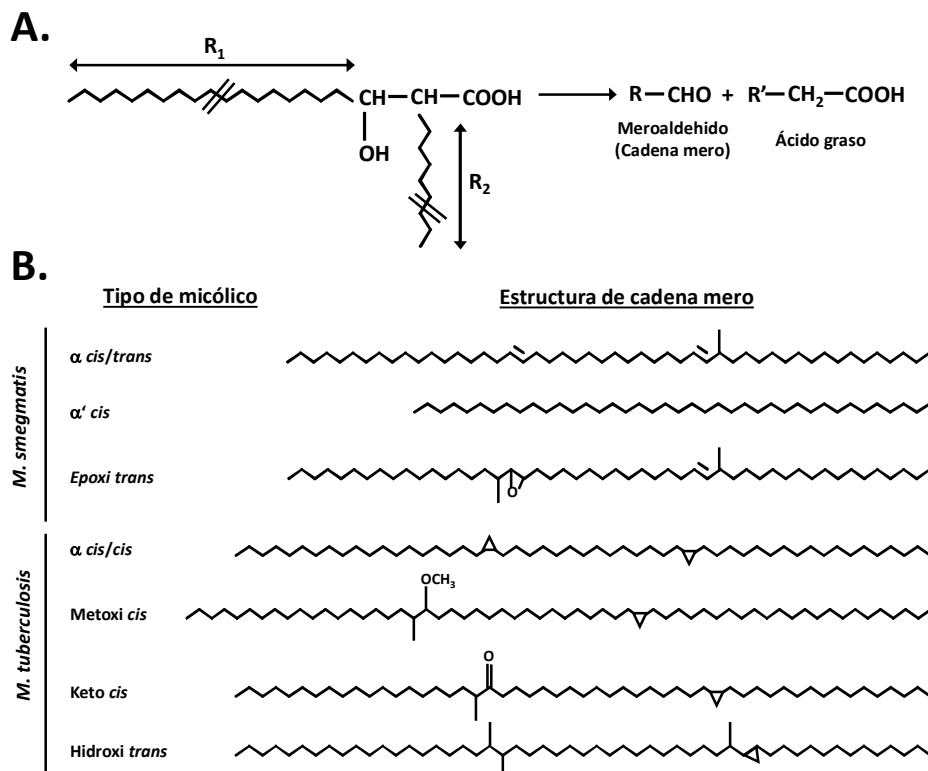


Figura 4. A. Estructura general de los ácidos micólicos. La ruptura de la estructura da lugar a un meroaldehído y a un ácido graso. **B. Estructuras de las cadenas mero de los principales tipos de ácidos micólicos presentes en micobacterias.** La configuración de los dobles enlaces y de los ciclopropanos puede ser tanto *cis* como *trans* (con un radical metilo adyacente). Adaptada de Marrakchi *et al.*, 2014.

La segunda familia de ácidos micólicos, posee grupos funcionales con oxígeno localizados en el extremo de la cadena meromicrobica dando lugar a los tipos keto-, metoxi-, epoxi- e hidroxi-ácidos micólicos (Figura 4 B), estos últimos están ausentes en algunas de las especies micobacterianas (Daffé *et al.*, 1983) y en los géneros del orden Corinebacteriales que no son micobacterias.

Los ácidos micólicos poseen características únicas tanto químicas como de plegamiento esenciales para el correcto mantenimiento de la estructura de la pared celular de las micobacterias (Villeneuve *et al.*, 2005). Además de la función estructural, el gran número de AMs presentes en la pared celular generan una superficie altamente hidrofóbica que confieren la

elevada impermeabilidad de las micobacterias a compuestos hidrofílicos (Jarlier y Nikaido, 1990). Por último, la composición y cantidad de ácidos micólicos son factores que afectan a procesos tan diversos como la virulencia, tasa de crecimiento, morfología de colonia y capacidad de formación de biofilms en *M. tuberculosis* (Dubnau *et al.*, 2000; Glickman *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1996). La gran cantidad de funciones que se atribuyen a los ácidos micólicos o a sus derivados glicosilados son un reflejo de la importancia de estas moléculas en el crecimiento y patogénesis de las micobacterias.

3.3.1.3. Membrana externa o cápsula

La capa externa de las micobacterias sirve de protección contra múltiples factores externos y en especies patógenas, tiene una interacción directa con los elementos de la respuesta inmune (Warwick *et al.*, 1994). Está constituida principalmente por trehalosa dimicolatos (TDMs; también denominado factor cuerda) y trehalosa monomicolatos (TMMs), que interaccionan directamente con los ácidos micólicos que se encuentran en el complejo mAGP. Mientras que estos dos compuestos se encuentran presentes en todos los géneros de micobacterias, existe una amplia variedad de glicolípidos (GLPs) y de ésteres de trehalosa específicos de especie como los di-, tri- y poli-aciltrehalosas (DATs, TATs y PATs), los sulfolípidos (SLs) y los lipooligosacáridos (LOSs).

La trehalosa 6,6'-dimicolato (TDM) es un glicolípido de superficie muy abundante en las membranas de las micobacterias que proporciona una potente barrera biológica. Este glicolípido juega un papel esencial en la respuesta inmunológica y en las interacciones micobacteria-huésped (Hunter *et al.*, 2009). Además, la TDM aumenta la impermeabilidad y por tanto la resistencia a antibióticos, a la citotoxicidad mediada por los ambientes ácidos o alcalinos y a la lisis osmótica entre otros, ayudando de esta manera la supervivencia de las especies patógenas dentro de los macrófagos (Daffé *et al.*, 1998; Chami *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 2007; Vergne *et al.*, 1998). En los TMM y los TDM, la trehalosa se encuentra esterificada en las posiciones 6 y 6' (TDM) y 6 (TMM) con los ácidos micólicos. Recientemente, se ha identificado la proteína MmpL3 como un transportador de membrana interna necesario para la translocación del TMM al periplasma, donde el TMM actúa como donador de ácidos micólicos en la formación del TDM (Grzegorzewicz *et al.*, 2012; Tahlan *et al.*, 2012). Se ha sugerido que el TMM podría constituir el medio a través del cual los ácidos micólicos se exportan a la pared celular y la membrana externa.

Dentro de los lípidos específicos de especie, la membrana externa de *M. smegmatis* se caracteriza por poseer dos compuestos adicionales, los glicopeptidolípidos (GPLs) y los lipooligosacáridos (LOS). Los glicopeptidolípidos (GPLs), constituyen el componente mayoritario de la capa externa de *M. smegmatis* estando también presente en algunas micobacterias no tuberculosas, como *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. abscessus* y *M. chelonae*. Estructuralmente, los GPLs consisten en un núcleo lipopeptidil que

consiste en una cadena acílica (C₃₀), un tripéptido compuesto por los aminoácidos D-fenilalanina, D-allo-treonina y D-alanina (Vergne y Daffé, 1998) y un grupo sacarídico unido al hidroxilo de la allo-treonina o L-alaninol. Se considera que los GPLs desempeñan un papel fundamental en la supervivencia de las micobacterias en el macrófago (Puzo, 1990) y que están relacionados con la agregación bacteriana, la motilidad, la formación de biofilm y la integridad de la pared celular. (Howard *et al.*, 2006; Kocinkova *et al.*, 2008). Los lipooligosacáridos (LOS) contienen un núcleo común de poliacil trehalosa O-metilada conteniendo una unidad mono o polisacárida. En una misma bacteria los LOS se presentan como una mezcla de compuestos que se diferencian por la composición del núcleo oligosacárido y por el número de ácidos grasos que la substituyen. Algunas características como la inmunogenicidad, la mediación en la unión a micobacteriófagos y la rugosidad de la morfología colonial están asociadas a la presencia de LOS (Asselineau y Lanéele, 1998).

La particular complejidad e hidrofobicidad de la pared celular micobacteriana representa por tanto un reto en el conocimiento sobre cómo los nutrientes y solutos son transportados a través de la misma. Pese a esta elevada complejidad, en los últimos años se están comenzando a entender algunos de los procesos de transporte que estos organismos han desarrollado para poder adaptarse a ambientes tanto extracelulares como intracelulares. Uno de los descubrimientos más relevantes en este sentido ha sido el de los denominados sistemas de transporte Mce, cuya relación inicial con procesos de patogénesis en *M. tuberculosis* los ha convertido en objeto de un intenso estudio en los últimos años.

4. Operones *mce*

El primer gen de un sistema Mce en ser identificado fue el gen de virulencia *mce1A* (de *mycobacterial cell entry*) de *M. tuberculosis* por su implicación en la entrada de micobacterias al interior de células eucariotas no fagocíticas, ya que su expresión en *E. coli* permitía la entrada de esta bacteria no invasiva al interior de las células epiteliales HeLa (Arruda *et al.*, 1993). El estudio posterior de su entorno genético reveló que el gen *mce1A* pertenecía a un operón que se encuentra 4 veces repetido en el genoma de *M. tuberculosis* denominándose operones *mce*. Cada operón se encontraba organizado exactamente de la misma manera con dos genes codificantes de proteínas de membrana seguidos por seis genes con dominios *mce*. Estos últimos además presentaban secuencias señal en su extremo N-terminal, sugiriendo una localización en la superficie celular de la bacteria (Cole *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2005).

A través de diferentes análisis bioinformáticos, se identificó la presencia de genes con dominios homólogos a los *mce* en todas las especies de *Mycobacterium* analizadas en un número variable entre 6 en *M. leprae* y hasta 66 en *M. vanbaalenii*. Otros genomas que se observó contenían genes *mce* pertenecían a especies de *Nocardia*, *Janibacter*, *Nocardioides*, *Amycolatopsis* y *Streptomyces*, todos ellos pertenecientes al grupo de las Actinobacterias. La

presencia de estos operones parece por tanto exclusiva de este *phylum*, sin embargo no se detectaron homólogos en ninguna de las 4 especies de *Corynebacterium* secuenciadas ni en las especies *Rubrobacter xylanophilus*, *Symbiobacterium thermophilum* y *Bifidobacterium longum* (Casali y Riley, 2007).

Aunque a raíz de su descubrimiento la función de estos operones se relacionó únicamente con patogénesis, la presencia de homólogos en especies saprófitas como *M. smegmatis* y el diferente efecto de aumento o disminución de virulencia observado en las mutaciones realizadas en estos *loci* (Shimono *et al.*, 2003; Sassetti *et al.*, 2003; Gioffre *et al.*, 2005) no permitían definir la función concreta de los sistemas Mce. Los primeros estudios realizados para intentar comprender la redundancia de estos sistemas dentro de un mismo organismo mostraron que los operones *mce* de *M. tuberculosis* presentaban una expresión diferencial dependiente de la fase de crecimiento, así mientras que el operón *mce1* cobraba especial importancia en los momentos iniciales de infección, el operón *mce4* se expresaba en fases más tardías (Kumar *et al.*, 2003). Estudios posteriores realizados en *M. smegmatis* confirmaron una expresión diferencial de estos operones dependiente de las condiciones de aeración, nutrición y fase de crecimiento. En medio rico solo se detectó la presencia del operón *mce4*, sin embargo bajo condiciones limitantes de nutrientes como en fase estacionaria o en cultivos estáticos, las bacterias expresaban todos los operones *mce* (Kumar *et al.*, 2005). El conjunto de estos resultados, sugerían que la existencia de diferentes sistemas Mce podría responder a diferentes requerimientos existentes en las distintas condiciones de crecimiento. Además, el posterior análisis *in silico* permitió sugerir por primera vez que los operones *mce* pudieran codificar sistemas de transporte gracias a la detección de dominios Ttg2B y Ttg2C típicos de proteínas implicadas en transporte, lo que podría justificar su presencia tanto en especies patógenas como saprofíticas (Kumar *et al.*, 2005).

En el año 2006 y para intentar comprender mejor la función de los operones *mce*, Joshi *et al.* realizaron un análisis sistemático en el que describieron la red de genes que genéticamente interactuaban con los *loci mce1* y *mce4*. Los resultados obtenidos y su comparación con los datos previos, permitieron a los autores postular que estos operones *mce* codificaban sistemas de transporte semejantes a los ABC con el gen *mceG* como ATPasa común a todos ellos. Además, se encontró que una gran proporción de genes relacionados o bien con funciones de transporte o de modificación y/o metabolismo de lípidos interactuaban con los sistemas Mce (Joshi *et al.*, 2006). Sin embargo, la identificación de componentes de transportadores ABC es compleja ya que presentan baja similitud de secuencia a nivel de nucleótido, por lo que fue necesario un exhaustivo estudio posterior mediante análisis bioinformáticos y minería de bases de datos de los operones *mce* localizados en *M. tuberculosis*, para confirmar la homología de estos sistemas con importadores de tipo ABC (Casali y Riley, 2007).

4.1. Transportadores de tipo ABC

Los transportadores ABC (ATP-binding cassette) pueden ser exportadores o importadores, representan una de las superfamilias de proteínas de membrana más abundantes y se caracterizan por la habilidad de unir e hidrolizar ATP con el objetivo de transportar sustratos a través de la bicapa lipídica (Higgins, 1992). Los exportadores ABC están presentes tanto en organismos procariotas como eucariotas y juegan un papel fundamental en procesos biológicos (Dean *et al.*, 2001), se han asociado con resistencias a drogas (Eckford y Sharom, 2009; Kerr *et al.*, 2010) o a diversas enfermedades humanas (Dean *et al.*, 2001; Fletcher *et al.*, 2010). En cuanto a los importadores ABC, se encuentran únicamente en plantas, procariotas y arqueas, y son responsables del transporte de nutrientes a través de las bicapas lipídicas. Además, los procariotas patógenos utilizan los importadores ABC para evadir las respuestas inmunes del huésped y se sabe que juegan un papel fundamental en procesos de patogenicidad y virulencia, por lo que el estudio de los mismos ha ido en aumento en los últimos años.

4.1.1. Tipos de importadores ABC

La suma de diferentes estudios genéticos, estructurales y bioquímicos en los importadores ABC ha permitido diferenciar 3 sistemas que utilizan ATP para transportar los diferentes sustratos a través de las membranas celulares (Tabla 1).

Los importadores ABC de tipo I se caracterizan porque la actividad ATPasa se activa cuando el sustrato se une a la SBP y porque en general, poseen menos hélices transmembrana que los importadores de tipo II. Además, es interesante destacar que tres de los cuatro importadores de tipo I caracterizados estructuralmente poseen un dominio regulador (RD) unido a las NBDs que controla la función de estos sistemas. En los importadores ABC de tipo II y a diferencia de los anteriormente descritos, la asociación de la SBP es en general más débil cuando el sustrato está presente (Lewinson *et al.*, 2010; Vigonsky *et al.*, 2013) y poseen un número más elevado de hélices transmembrana que los importadores de tipo I. La regulación en estos sistemas es aún desconocida, pero se sabe que estos sistemas se pueden regular por el sustrato a nivel de la transcripción (Rice *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2005; Andrews *et al.*, 2003). Por último los transportadores ECF (energy-coupling factor), recientemente descritos, juegan un papel esencial en el transporte de micronutrientes en bacterias y arqueas. Poseen una estructura similar a los importadores de tipo I y de tipo II: dos dominios de unión a nucleótido (EcfA y EcfA') y un dominio transmembrana (EcfT) sin embargo en lugar de proteínas de unión a sustrato, los transportadores ECF tienen una característica única: el componente EcfS, una proteína integral de membrana que se une al sustrato con afinidad nanomolar o picomolar (Duurkens *et al.*, 2007; Hebbeln *et al.*, 2007).

Importadores de Tipo I	Organismo	Nº acceso PDB	Referencias
Transportador del molibdato Complejo ModB ₂ C ₂ A	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2ONK	Hollenstein <i>et al.</i> , 2007
ModBC	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	3D31	Gerber <i>et al.</i> , 2008
Transportador de la maltosa MalFGK ₂	<i>Escherichia coli</i>	2R6G, 3FH6, 3PUY, 3PUV, 4JBW, 4KHZ	Oldham <i>et al.</i> , 2007; Khare <i>et al.</i> , 2009; Oldham and Chen 2011a; Oldham and Chen 2011b; Chen <i>et al.</i> , 2013; Oldham <i>et al.</i> , 2013
Transportador de la metionina	<i>Escherichia coli</i>	3TUI	Johnson <i>et al.</i> , 2012
Importadores de Tipo II	Organismo	Nº acceso PDB	Referencias
Transportador de la vitamina B ₁₂ BtuC ₂ D ₂	<i>Escherichia coli</i>	1L7V, 2Q19, 4FI3, 4DBL	Locher <i>et al.</i> , 2002; Hvorup <i>et al.</i> , 2007; Korkhov <i>et al.</i> , 2012b; Korkhov <i>et al.</i> , 2012a
Transportador hemo HmuU ₂ V ₂	<i>Yersinia pestis</i>	4GIU	Woo <i>et al.</i> , 2012
Transportador del molibdato MolBC(HI1470/I)	<i>Haemophilus influenzae</i>	2NQ2	Pinkett <i>et al.</i> , 2007
Importadores ECF	Organismo	Nº acceso PDB	Referencias
Transportador del folato	<i>Lactobacillus brevis</i>	4HUQ	Xu <i>et al.</i> , 2013
Transportador de hidroximetil pirimidina	<i>Lactobacillus brevis</i>	4HZU	Wang <i>et al.</i> , 2013

Tabla 1. Estructuras de importadores ABC cristalizadas hasta la fecha. Adaptada de ter Beek *et al.*, 2014.

4.1.2. Componentes de los importadores ABC

En general, los transportadores de tipo ABC están constituidos por dos dominios citoplasmáticos de unión a nucleótido (NBDs o ATPasa) y dos dominios permeasa que forman canales transmembranales (TDMs o permeasas). Estos componentes pueden ser homo- o heterodímeros y pueden codificarse de forma separada o como polipéptidos fusionados. En el caso de los importadores, se requieren proteínas de unión a sustrato (SBPs) adicionales a los componentes anteriormente citados, que proveen especificidad y elevada afinidad al transporte. Normalmente, estas SBPs son periplásmicas en bacterias Gram-negativas y lipoproteínas o proteínas asociadas a la membrana en el caso de bacterias Gram-positivas.

Los sistemas de transporte ABC poseen una serie de componentes característicos que permiten su identificación en los diferentes organismos:

A. NBD (Nucleotide Binding Domain o ATPasa)

Los transportadores ABC poseen dos NBDs (Nucleotide Binding Domain), también denominados ATPasas, que unen e hidrolizan el ATP proporcionando la energía necesaria para el transporte del sustrato. Las ATPasas ABC están inusualmente conservadas mostrando identidades superiores al 30% de media entre diferentes proteínas y pueden ser identificadas a nivel de secuencia gracias a la presencia de 7 motivos altamente conservados:

- El loop-A: Contiene un residuo aromático conservado (normalmente una tirosina) que ayuda a posicionar el ATP.
- El motivo Walker A (GXXGXGK(S/T)): Bucle que forma una red de interacciones con el fosfato β - y γ - del ATP.
- El motivo Walker B ($\phi\phi\phi\phi$ DE, donde ϕ es un aminoácido hidrofóbico): El residuo aspartato coordina los iones magnesio mientras que el glutamato es esencial para la hidrólisis del ATP.
- El loop-D (SALD): Afecta a la geometría del sitio catalítico y ayuda a la formación del sitio de hidrólisis del ATP.
- El loop-H: El residuo de histidina interacciona con el aspartato del loop-D, el glutamato del motivo Walker B y el γ -fosfato del ATP ayudando al correcto posicionamiento del agua atacante y el ión magnesio.
- El loop-Q: Los cambios conformacionales en esta región permiten la movilidad del residuo de glutamina dentro y fuera del sitio activo durante el ciclo de hidrólisis formando el sitio activo cuando el Mg-ATP está unido y bloqueándolo una vez que el ATP se hidroliza.
- El motivo ABC (LSGGQ): Motivo característico de la superfamilia de transportadores ABC cuya función parece ser la de transmitir señales desde el NBD al TMD (Borges-Walmsley *et al.*, 2003).

B. TMD (Transmembrane Domains o permeasas)

En todos los transportadores ABC, los TMD constituyen un poro a través de las membranas celulares que es accesible alternativamente desde la parte *cis*- y la parte *trans*- de la misma para permitir el transporte del sustrato específico. Al contrario de lo que ocurre con las ATPasas, estos componentes suelen presentar bajas homologías a nivel de secuencia pero sí muestran un elevado grado de conservación topológica dentro de la misma clase de transportadores. La falta de conservación en la estructura primaria de los TMDs probablemente sea debido a la diversidad de los sustratos que se transportan por estos sistemas.

Los TMDs están constituídos por una serie de α -hélices que atraviesan la membrana múltiples veces en forma de zig-zag. Los TMDs de los importadores de tipo I son idénticos (homodímeros) o estructuralmente similares con una topología de cinco hélices transmembrana por TMD (Kadaba *et al.*, 2008). Los importadores de tipo II poseen dos TMD idénticos

(homodímeros), cada uno de los cuales tiene 10 hélices transmembrana (Jones *et al.*, 2009) con un empaquetamiento similar pero en orientación opuesta con respecto a la membrana. En los importadores ECF, ninguno de los dos TMDs están ni estructural ni funcionalmente relacionados; el primer TMD denominado componente EcfT posee entre 4 y 8 hélices transmembrana (Finkenwirth *et al.*, 2010), el segundo TMD denominado componente S posee 6 hélices transmembrana (Zhang *et al.*, 2010; Erkens *et al.*, 2011) y está implicado en la unión del sustrato.

Aunque como ya se ha comentado los TMDs presentan una similitud de secuencia mucho inferior que las ATPasas ABC, existen un dominio conservado (de unos 20 aminoácidos) en los extremos C-terminal de los TMDs de los importadores denominado motivo EAA o loop-L que habitualmente se localiza en el bucle citoplasmático entre los dominios transmembrana 5 y 6 (Saurin *et al.*, 1994). Estos bucles contienen mayoritariamente residuos hidrofílicos (consistente con una exposición de este dominio al citosol) y se sabe están implicados en la interacción con el loop-Q de las ATPasas (Oldham *et al.*, 2007). Los bucles EAA están ausentes en los exportadores ABC, aunque recientemente se ha identificado la secuencia que podría estar implicada en la interacción TMD-ATPasa en estos sistemas (Dawson y Locher, 2006).

C. SBPs (Substrate Binding Proteins o proteínas de unión a sustrato)

Los importadores de tipo I y tipo II requieren la presencia de proteínas adicionales de unión a sustrato (SBP) además de las 4 subunidades descritas anteriormente (2 NBDs y 2 TMDs) para ser funcionales. Las SBPs son proteínas que poseen gran afinidad por el sustrato a transportar con constantes de disociación a menudo en el rango de 0.01 a 1 μ M (Davidson *et al.*, 2008).

Las SBPs se encuentran o bien unidas con el TMD del transportador como un solo polipéptido, ancladas a membrana a través de un dominio lipídico (bacterias Gram-positivas y arqueas) o solubles en el periplasma (bacterias Gram-negativas). Pese a que las SBPs pueden variar considerablemente en secuencia, tamaño y especificidad de sustrato, poseen una estructura cuaternaria bastante conservada formada por dos lóbulos con una hendidura central que sufre un cambio conformacional tras la unión del ligando, lo que promueve su interacción con las permeasas del sistema. En base a su estructura, las SBPs se pueden clasificar en 6 clúster diferentes dependiendo de la presencia o ausencia de dominios adicionales y de la estructura de la hendidura central (Berntsson *et al.*, 2010).

Las SBPs se encuentran habitualmente en conformación abierta, cuando el sustrato se une la proteína se estabiliza en una conformación cerrada y el ligando queda atrapado entre los dos lóbulos y posteriormente se traslada al sistema de transporte interaccionando con ambos TMDs (Higgins, 1992; Hvorup *et al.*, 2007). Algunos de los importadores ABC de tipo I y tipo

II pueden transportar varios sustratos bien porque sus SBPs son capaces de reconocer diferentes ligandos (Tao *et al.*, 1993) o porque el transportador puede interactuar con diferentes SBPs (Higgins y Ames, 1981; Leonard *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1998), sin embargo, la interacción de diversas SBPs con el mismo translocador es un proceso relativamente raro.

4.2. Componentes de los operones *mce*

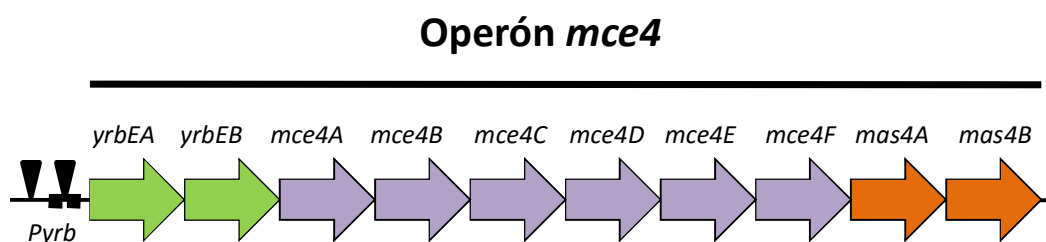


Figura 5. Organización génica del operón *mce4* de *M. smegmatis* mc²155. Se indican con diferentes colores los genes que pertenecen a diferentes grupos funcionales. Verde: TMDs o permeasas; Morado; SBPs o proteínas de unión a sustrato; Naranja: Proteínas Mas.

Como ya se ha comentado anteriormente, los operones *mce* presentan homología con importadores ABC sin embargo, los sistemas Mce poseen una organización y características que los diferencian de los transportadores descritos hasta el momento. Los operones *mce* contienen entre 8 y 12 genes que codifican proteínas con homología a las permeasas y proteínas de unión a sustrato típicas de los sistemas de importación ABC (Fig. 5). Cada operón se encuentra idénticamente organizado y comienza con dos genes denominados *yrbE* cada uno de los cuales contiene 6 dominios transmembrana con homología a permeasas. El operón continúa con 5 genes que comparten homología con las proteínas de unión a sustrato y el gen *lpr* que codificaría una lipoproteína. El tercer conjunto de genes que forman parte de los operones *mce* está compuesto por las proteínas Mas (Mce Associated Proteins) cuya presencia no ha sido descrita anteriormente en ningún sistema ABC por lo que su función es totalmente desconocida. Aunque estos sistemas han cobrado especial importancia en los últimos años, existe escasa información funcional y estructural de las proteínas que forman parte de estos sistemas.

4.2.1. Proteínas transmembrana o permeasas (TMDs)

En todos los operones *mce* analizados hasta el momento existen dos genes codificantes de proteínas homólogas a permeasas denominadas YrbEA/YrbEB en *Mycobacterium* y SupA/SupB en *Rhodococcus*. Como se ha comentado en el apartado anterior, las permeasas ABC normalmente poseen 6 segmentos transmembrana con el extremo C-terminal localizado en el lado citoplasmático de la membrana (Boos y Eppler, 2002). Las proteínas YrbE son similares a las permeasas presentes en los sistemas ABC convencionales, sin embargo, la predicción de su

estructura sugiere la presencia de 5 o 6 hélices transmembrana con el extremo C-terminal localizado en el lado externo (Figura 6).

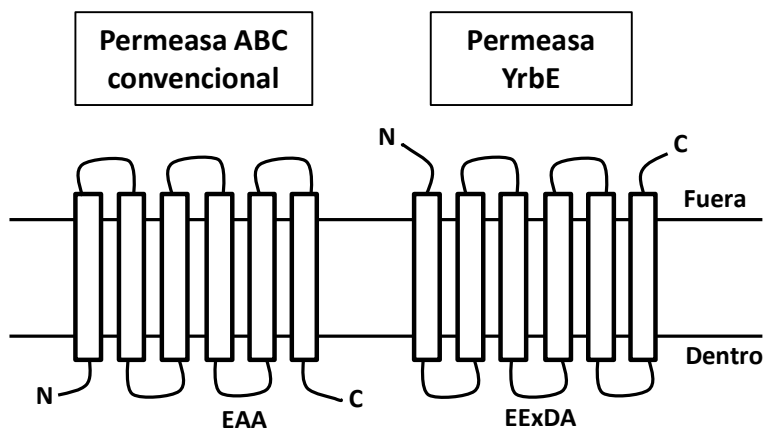


Figura 6. Predicción de la topología consenso de las proteínas YrbE en comparación con las permeasas ABC típicas. Adaptada de Casali *et al.*, 2007.

Las ATPasas encargadas de energizar los transportadores ABC interaccionan físicamente con las permeasas (Davidson y Chen 2004, Hollenstein *et al.*, 2007b) a través de una secuencia altamente conservada en el bucle citoplasmático final que fue denominado motivo EAA (Saurin *et al.*, 1994). El análisis del alineamiento múltiple de las proteínas YrbE indicó que el motivo EAA no se encuentra presente en las permeasas de los sistemas Mce (Casali *et al.*, 2007), lo que constituye una diferencia significativa con respecto a los sistemas ABC descritos hasta el momento.

4.2.2. Proteínas de unión a sustrato (Substrate Binding Proteins)

Las SBPs generalmente están codificadas únicamente por uno o dos genes (Boos y Eppler, 2002) por lo que la presencia de seis genes codificantes para SBPs es, hasta la fecha, una característica única de los transportadores Mce presentes en las Actinobacterias. Usando métodos computacionales, Pajon *et al.* (2006), identificaron patrones de cadenas- β transmembranales, típicamente asociados a proteínas de membrana, en ocho de las proteínas Mce de *M. tuberculosis*, sugiriendo por tanto que esta región de las proteínas Mce podría formar un canal que atraviesa la bicapa lipídica promoviendo la penetración de sustancias a través de la membrana exterior. Esta idea, fue apoyada posteriormente por Song *et al.* (2008) en un trabajo en el que propusieron que los genes *mceA-F* de *M. tuberculosis* codifican proteínas de membrana externa (OMPs). Basándose en todos estos estudios y predicciones, se ha hipotetizado que las SBPs de los sistemas Mce se localizan en la superficie y/o en la pared celular bacteriana (Shimono *et al.*, 2003) sin embargo, hasta el momento esta localización solo se ha podido demostrar para la proteína Mce1A (Chitale *et al.*, 2001).

Igual que ocurre con el resto de proteínas de los operones *mce*, existen escasos estudios acerca de la posible función de las proteínas MceA-F que forman parte de estos sistemas y el motivo de la presencia del elevado número de las mismas en un mismo sistema de transporte constituye una incógnita. En cuanto a posibles funciones adicionales de estas proteínas, tanto el gen *mce1A* como el gen *mce4A* han sido asociados con la entrada de *M. tuberculosis* al interior de la célula huésped y con la supervivencia intracelular del patógeno (Saini *et al.*, 2008).

4.2.3. Proteínas asociadas a los Mce (Mce Associated Proteins)

Las proteínas Mas son las últimas codificadas en tres de los cuatro operones *mce* de *M. tuberculosis* y muestran una secuencia conservada en la región C-terminal o dominio Mas de aproximadamente 160 aminoácidos el cual se localizaría según las predicciones en el lado extracelular de la membrana citoplasmática. Estas proteínas no se encuentran presentes en todos los operones *mce*, por lo que se ha postulado que o bien su función no es estrictamente necesaria o puede compartirse entre diferentes operones. La propensión de los genes *mas* a localizarse en parejas sugiere que puedan formar heterodímeros, cuya interacción mantendría las proteínas Mas ancladas a la superficie celular (Casali *et al.*, 2007).

Pese a que la presencia de estos genes adicionales en los operones *mce* es novedosa con respecto a los sistemas ABC descritos hasta el momento, las proteínas Mas muestran una evolución filogenética en común con la ATPasa, las permeasas y las proteínas Mce de los genomas de Actinobacterias, indicando una implicación en la función de los transportadores Mce. Los análisis bioinformáticos realizados sobre las arquitecturas de estas proteínas sugieren que el dominio conservado Mas podría jugar un papel accesorio a la unión del ligando (Casali *et al.*, 2007), y aunque su función no ha sido probada se ha demostrado en el caso del operon *mce4* que su expresión es esencial para el transporte de colesterol en *R. jostii* RHAI (Mohn *et al.*, 2008).

4.2.4. Componente ATPasa

Los análisis de homología y las evidencias funcionales indican que los *loci mce* codifican importadores ABC sin embargo, ninguno de estos operones contienen en su cercanía una proteína adenosintrifosfatasa (ATPasa) necesaria para energizar el sistema. Los estudios de Joshi *et al.* (2006) fueron los primeros que demostraron que el gen *rv0655* también denominado *mceG*, codificaba una ATPasa que interaccionaba funcionalmente con los sistemas Mce1 y Mce4 en *M. tuberculosis*. En el mismo trabajo estos autores también observaron que la correcta expresión de las proteínas YrybE1A y YrbE1B, las permeasas del operón *mce1*, era necesaria para conseguir una expresión estable de la proteína MceG en *M. smegmatis*. Este resultado confirmaba una relación directa entre los sistemas Mce y la ATPasa MceG y sugería que los operones *mce* podrían encontrarse formando un complejo proteico en el que todas las proteínas, incluida la ATPasa, son necesarias para la correcta estabilización del mismo.

El estudio bioinformático posterior mostró que la proteína MceG se encuentra muy conservada dentro de las Actinobacterias y forma parte de la familia Mkl de ATPasas ABC dependientes de proteínas de unión a sustrato. Además, la identificación en el gen *mceG* de los motivos Walker A y Walker B necesarios para la unión de ATP así como la secuencia característica de la familia de transportadores ABC, LSGGC, apoyaban la función de la proteína MceG como ATPasa de sistemas ABC (Casali *et al.*, 2007). No fue hasta un trabajo posterior cuando se verificó la relación del gen *rv0655* con el sistema de transporte de colesterol mediado por el operón *mce4* en *M. tuberculosis*, siendo la primera prueba experimental que asociaba una ATPasa con los sistemas de transporte Mce (Pandey *et al.*, 2008).

4.2.5. Otras proteínas que interaccionan con los operones *mce*

A pesar del elevado número de componentes existentes en los sistemas Mce, durante los últimos años han surgido diversos estudios que parecen ampliar la complejidad de estos sistemas demostrando la implicación de un mayor número de proteínas en su función.

Joshi *et al.* (2006) describieron que en *M. tuberculosis* el gen que codifica la bomba de flujo P55 interaccionaba con los sistemas Mce1 y Mce4 *in vivo*, sugiriendo por tanto que estos sistemas dependían de P55 para realizar una función conjunta. Los estudios de crecimiento realizados con el mutante en la proteína P55, muestran un crecimiento disminuido de esta cepa en colesterol y por tanto apoyan la hipótesis de que la bomba actúa o bien en el mantenimiento del metabolismo general o como una subunidad del sistema de transporte Mce4 (catalizando su ensamblaje o proporcionando integridad a la pared celular para permitir un transporte de colesterol más eficiente) (Ramón-García S. *et al.*, 2015).

Las micobacterias, forman parte de un selecto grupo de bacterias que poseen dos ATPasas SecA no redundantes denominadas SecA1 y SecA2. Mientras que SecA1 energiza la translocación de proteínas no plegadas a través de un canal formado por las proteínas SecYEG, SecA2 posee por lo general una función no esencial asociada a la exportación de un número limitado de proteínas o a virulencia (Feltcher *et al.*, 2012; Bensing *et al.*, 2014). Estudios recientes realizados con la cepa *M. tuberculosis* Δ SecA2 (Feltcher *et al.*, 2015), muestran que 6 de las 10 proteínas codificadas en el operón *mce4* se encuentran significativamente disminuidas en la pared celular del mutante, observando un efecto similar con proteínas del sistema Mce1 y la ATPasa MceG. Estos resultados sugieren una posible función de la proteína SecA2 en la exportación de numerosos componentes de los sistemas Mce1 y Mce4. Aunque es posible que el sistema SecA2 esté implicado únicamente en la exportación de alguno de los componentes Mce4 y que sea la falta de ese componente particular lo que desestabilice el resto del complejo, es evidente la dependencia de SecA2 en la localización en pared celular de estos sistemas de transporte Mce.

El gen *Rv1422*, denominado *cuvA*, también fue identificado en el análisis de las interacciones génicas con los loci *mce1* y *mce4* llevados a cabo por Joshi *et al.* (2006). Tanto en *M. tuberculosis* como en *M. smegmatis*, mutantes en el gen *cuvA* muestran diferencias en el crecimiento en diferentes fuentes de carbono, incluyendo el colesterol, así como morfologías aberrantes y un marcado aumento en la sensibilidad a antibióticos β -lactámicos, especialmente en la cepa *M. smegmatis* Δ *cuvA*. Estos datos, junto con la descrita interacción génica de CuvA descrita por Joshi *et al.* (2006) con los loci *mce4* y *mce1* (que ha sido relacionado con el reciclaje de ácidos micólicos) sugieren que el gen *cuvA* es necesario para el transporte de nutrientes en micobacterias. Una de las explicaciones al amplio efecto en el transporte de diferentes nutrientes sería la alteración de la superficie celular en las cepas mutantes Δ *cuvA* que afecten a la permeabilidad de la membrana. (Mir *et al.*, 2014).

4.3. Funciones asociadas a los operones *mce*

4.3.1. Operones *mce1*, *mce2* y *mce3*

La relación de los sistemas Mce con la patogénesis de *M. tuberculosis* ha incentivado un extenso estudio de los operones presentes en esta bacteria. Pese a que como se ha comentado anteriormente todos estos sistemas han sido relacionados con procesos de importación de lípidos, las investigaciones recientes sugieren que la función de los operones podría no estar limitada a este tipo de procesos.

Debido a su implicación directa en la patogénesis de *M. tuberculosis* el operón *mce1* ha sido con diferencia el más estudiado hasta el momento. Originalmente este sistema se relacionó únicamente con el proceso de entrada micobacteriana al interior celular, sin embargo estudios posteriores han sugerido que parece estar también relacionado con el reciclaje de ácidos micólicos extracelulares para su uso como fuente de carbono (Dunphy *et al.*, 2010). Los últimos estudios llevados a cabo dan un paso más y relacionan el sistema Mce1 con un complejo mecanismo de adaptación de la micobacteria al ambiente hostil del huésped en el cual el sistema Mce1 permite a *M. tuberculosis* iniciar una respuesta transcripcional inmediata promoviendo un ambiente anti-inflamatorio y rico en nutrientes (mediando la acumulación de colesterol tras la entrada de la bacteria en el macrófago) facilitando por tanto la supervivencia del bacilo (Stavrum *et al.*, 2012).

Los primeros estudios realizados sobre el sistema Mce2 indicaban que la mutación de estos genes aumentaba la acumulación de sulfolípidos en la membrana de la bacteria, afectando por ello el arresto de la maduración del fagosoma y por tanto la supervivencia del mutante Δ *mce2* (Gioffre *et al.*, 2005). Los estudios posteriores de Marjanovic *et al.* (2011) confirmaron este efecto al comprobar que el mutante Δ *mce2* de *M. tuberculosis* acumula más sulfolípidos (SLs) que la cepa parental, proponiendo que el sistema Mce2 contiene proteínas implicadas en el transporte y/o metabolismo de estos compuestos. Además, el hallazgo de que el factor sigma

L, relacionado con el control de genes implicados en la síntesis de la envoltura celular (Dainese *et al.*, 2006), regula la expresión de los genes *mce2* y de genes implicados en la síntesis de SL así como el hecho de que este operón esté ausente en *M. smegmatis*, que no produce SLs, apoyan el papel de las proteínas Mce2 en el transporte de estos componentes de membrana.

El estudio del operón *mce3* se ha realizado a través del represor Mce3R, que mostró que este regulador controla la expresión tanto del sistema de transporte codificado por el operón *mce3* como de enzimas adicionales que se ha postulado podrían estar implicadas en la modificación del sustrato transportado por el mismo. Aunque el sustrato de este transportador es desconocido, la existencia de cambios en el contenido lipídico del mutante $\Delta mce3R$ con respecto a la cepa parental en *M. tuberculosis* y el estudio *in silico* de los genes regulados por este represor, sugieren que el operón *mce3* codifica un sistema de transporte lipídico que proporciona al patógeno fuentes de carbono y energía adicionales (Santangelo *et al.*, 2009b).

4.3.2. Operón *mce4*

La función del operón *mce4* ha sido demostrada experimentalmente siendo el responsable del transporte de colesterol en *M. tuberculosis* y *R. jostii* RHA1 (Mohn *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2008). Además su presencia es esencial para la supervivencia de *M. tuberculosis* durante los tiempos prolongados de infección (Sasseti *et al.*, 2003; Joshi *et al.*, 2006). El análisis de las bases de datos de secuencias génicas indica que, además de *Mycobacterium*, diversas Actinobacterias entre las que se incluyen los géneros *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*, tanto patógenas como saprófitas, contienen este locus *mce* (Casali *et al.*, 2007; Mohn *et al.*, 2008). Recientemente, se ha comprobado que distintos mutantes de *R. jostii* RHA1 en el locus *mce4* son incapaces tanto de transportar colesterol como de crecer en este esteroide como única fuente de carbono (Mohn *et al.*, 2008). Esta incapacidad de crecimiento se manifiesta también con moléculas con estructura similar como son el β -sitosterol, el 5 α -colestanol y la 5 α -colestenoína, que poseen una cadena lateral en C17 de 8 o más átomos de carbono. Sin embargo, el crecimiento de estos mutantes en otros compuestos con cadenas laterales más cortas y más polares como el ácido cólico o la progesterona, o en compuestos que carecen de cadena lateral, como el AD, no se ve afectado (Mohn *et al.*, 2008), lo que sugiere una especificidad de estos transportadores por los esteroides con cadena lateral. Por otro lado, los mutantes de *M. tuberculosis* en los genes *yrbE4A* (permeasa A del operón *mce4*) y *mceG* (ATPasa) presentan un escaso crecimiento en colesterol que se recupera a tiempos largos, lo que sugiere la existencia de otro sistema de transporte secundario (Pandey *et al.*, 2008). Así mismo, los mutantes en estos genes presentan una virulencia disminuída en modelos animales (Pandey *et al.*, 2008).

A diferencia de lo que ocurre en *M. tuberculosis*, en *M. smegmatis* se han identificado seis operones *mce* (Casali *et al.*, 2007). Aunque el operón *mce4* también ha sido descrito como responsable del transporte de colesterol en este organismo, los ensayos de transporte radiactivo

y las curvas de crecimiento realizadas con el mutante $\Delta mce4$ de *M. smegmatis* muestran que sigue existiendo un transporte residual al interior celular, que podría deberse a otro sistema de transporte menos importante o simplemente debido a un transporte por difusión pasiva (Klepp *et al.*, 2012). El hecho de que este *locus* esté presente en micobacterias saprófitas no patógenas como *M. smegmatis*, indica que su función puede no haberse mantenido exclusivamente debido a su implicación en la virulencia (Mohn *et al.*, 2008) sino que más allá de su papel en patogénesis, es el responsable de la captación de sustratos tan abundantes en la naturaleza.

4.4. Regulación de los operones *mce*

Las diferencias de expresión génica de los operones *mce* dependientes de fase de crecimiento y tejido infectado en *M. tuberculosis* (Kumar *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2005) sugieren la existencia de mecanismos regulatorios que controlan la transcripción de los operones *mce*. A la vista de los datos existentes hasta el momento, la existencia de una regulación diferencial así como la duplicación génica, asegurarían la producción de sistemas Mce en diferentes ambientes y situaciones.

Casali *et al.* (2006) identificaron por primera vez el mecanismo de regulación que controla la expresión del operón *mce1* en *M. tuberculosis* en el cual el gen *Rv0165c* un regulador transcripcional de la subfamilia GntR, reprime la expresión del operón *mce1*. El operón *mce2* por su parte está regulado por la proteína Mce2R (*Rv0586*), un represor transcripcional de la familia GntR (Santangelo *et al.*, 2009a). En este trabajo, se demostró que este regulador reprime la expresión de las proteínas Mce2 durante el crecimiento *in vitro* de *M. tuberculosis* en medio rico, sugiriendo que Mce2R permite la expresión del operón *mce2* cuando la bacteria se encuentra en ambientes o situaciones desfavorables. La expresión del operón *mce3* se encuentra regulada por el regulador transcripcional Mce3R (*Rv1963*), perteneciente a la familia TetR que además también está implicado en la regulación de la expresión de dos unidades transcripcionales más: *Rv1936-Rv1941* y *Rv1933c-Rv1935c*, sugiriendo una relación funcional entre los productos codificados en los 3 operones (Santangelo *et al.*, 2009b).

La expresión del operón *mce4* está regulada por la proteína KstR, regulador de la familia TetR que actúa como represor transcripcional de genes relacionados con el metabolismo del colesterol (Kendall *et al.*, 2007) comentado anteriormente en la Introducción (ver apartado 2.3). El represor KstR se une a un compuesto intermediario 3OChA (ácido 4-colesten-3-ona-26-oico o ácido 3-oxo-colestenoico) de la degradación del colesterol permitiendo la transcripción de los genes a los que regula (García-Fernández *et al.*, 2014). Además existen estudios que muestran la inducción del operón *mce4* en condiciones de estrés de superficie e hipoxia (Rathor *et al.*, 2013).

IV. OBJETIVOS

El estudio del catabolismo bacteriano del colesterol ha adquirido una gran relevancia en los últimos años debido a su implicación en la patogenicidad de las micobacterias, así como al interés por la producción biotecnológica de compuestos esteroideos para la industria farmacéutica. A pesar de los avances realizados en los últimos años en la caracterización de la ruta catabólica del colesterol en dichas bacterias, una de las etapas menos estudiadas hasta el momento en la degradación bacteriana del colesterol es el mecanismo de transporte del mismo al interior celular.

Por todo ello, al inicio de esta Tesis Doctoral se propusieron los siguientes objetivos:

1. Identificación y caracterización de la ATPasa que energiza el sistema de transporte activo de colesterol en *M. smegmatis* mc²155

Para identificar y caracterizar la ATPasa implicada en el transporte activo del colesterol se plantearon los siguientes objetivos parciales.

- Identificación genética y estudio *in silico* de la ATPasa MceG implicada en el transporte activo del colesterol.
- Estudio de las implicaciones fisiológicas de la ATPasa MceG en el metabolismo de colesterol y la adaptación a situaciones de estrés en *M. smegmatis*.
- Análisis de la relevancia de la región C-terminal en la funcionalidad de la ATPasa MceG durante el transporte activo de colesterol.

2. Estudio del operón *mce4* y su implicación en el transporte activo de colesterol en *M. smegmatis* mc²155

En este objetivo se pretende identificar el sistema de transporte activo de colesterol en *M. smegmatis*, analizar la necesidad de sus componentes y profundizar en el conocimiento existente acerca de las funciones de este sistema. Para ello se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- Análisis *in silico* del operón *mce4* en *M. smegmatis* mc²155.
- Estudio del operón *mce4* como sistema de transporte activo de colesterol y determinación de los genes imprescindibles para su actividad.
- Identificación de otras funciones adicionales implicadas en el metabolismo de la envuelta celular.

3. Aplicaciones biotecnológicas.

Con el fin de aplicar los estudios derivados de los objetivos anteriores en la mejora de los procesos actuales de biotransformaciones de esteroides de interés industrial se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Expresión del sistema de transporte de colesterol Mce4 en *C. glutamicum*.
- Caracterización bioquímica de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (*MSMEG_5228*) que cataliza el primer paso de degradación del colesterol en *M. smegmatis* mc²155.
- Utilización de *Corynebacterium glutamicum* como hospedador heterólogo de genes implicados en biotransformaciones de esteroides de interés biotecnológico.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 2 junto con sus genotipos y características más relevantes. Los plásmidos empleados para la clonación, mutación y expresión génica, junto con sus características más importantes se muestran en la Tabla 3. Todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron adquiridos en Sigma-Genosys y se muestran en la Tabla 4, donde además de su secuencia se indica también la aplicación para la que fueron utilizados.

Tabla 2. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo

Cepas	Fenotipo/Genotipo	Referencia
<i>Mycobacterium smegmatis</i>		
mc ² 155	ept ⁻¹ , mutante de mc ² 6 eficiente para electroporación	(Snapper <i>et al.</i> , 1990)
Δ1366	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_1366</i> deleciónado	Este trabajo
Δ1366ΔKstR	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con los genes <i>MSMEG_1366</i> y <i>MSMEG_6042</i> deleciónados	Este trabajo
Δ5901	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_5901</i> deleciónado	Este trabajo
ΔyrbE4	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con los genes <i>MSMEG_yrbE4</i> deleciónados	Este trabajo
Δ5900	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_5900</i> deleciónado	Este trabajo
Δ5899	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_5899</i> deleciónado	Este trabajo
Δ5898	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_5898</i> deleciónado	Este trabajo
Δ5897	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_5897</i> deleciónado	Este trabajo
Δ5896	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_5896</i> deleciónado	Este trabajo
Δ5895	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_5895</i> deleciónado	Este trabajo
Δ5894	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_5894</i> deleciónado	Este trabajo
Δ5893	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_5893</i> deleciónado	Este trabajo
Δmce4op	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con el operón <i>mce4</i> deleciónado	Este trabajo

Cepas	Fenotipo/Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	F ⁻ , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr\ hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ^- , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB(rB-mB-)</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , $\lambda DE3$ (portador del gen 1 de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor PlacUV5)	Sambrook <i>et al.</i> , 2001
<i>Rhodococcus erythropolis</i>		
<i>R. erythropolis</i> IGTS8	<i>dsz</i> ⁺	Kilbane <i>et al.</i> , 1989
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
<i>C. glutamicum</i> R31	MeLis ^R , Aec ^R eficiente para transformación	Santamaría <i>et al.</i> , 1985

Tabla 3. Plásmidos y construcciones empleadas en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pJQ200x	Vector de clonación no replicativo en micobacterias utilizado para la construcción de mutantes por recombinación homóloga, P15A <i>ori</i> , <i>sacB</i> , <i>Gm^R</i> , <i>xylE</i>	Jackson <i>et al.</i> , 2001
pJQUD1366	pJQ200x que contiene los fragmentos UP-1366 y DOWN-1366 empleado para la construcción del mutante $\Delta 1366$, <i>Gm^R</i>	Este trabajo
pJQUDyrbE4	pJQ200x que contiene los fragmentos UP-yrbE4 y DOWN-yrbE4 empleado para la construcción del mutante $\Delta yrbE4$, <i>Gm^R</i>	Este trabajo
pJQUD5901	pJQ200x que contiene los fragmentos UP-5901 y DOWN-5901 empleado para la construcción del mutante $\Delta 5901$, <i>Gm^R</i>	Este trabajo
pMV261	Vector de expresión en micobacterias bajo el control del promotor <i>P_{Hsp60}</i> <i>Km^R</i>	Stover <i>et al.</i> , 1991
pMV1366	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_1366</i> clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI/HindIII</i> y empleado en la complementación del mutante $\Delta 1366$, <i>Km^R</i>	Este trabajo
pMV5901	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_5901</i> clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI/HindIII</i> y empleado en la complementación del mutante $\Delta 5901$, <i>Km^R</i>	Este trabajo
pMVyrbE4	pMV261 que contiene los genes <i>MSMEG_yrbE4</i> clonados entre las dianas de restricción <i>EcoRI/HindIII</i> y empleado en la complementación del mutante $\Delta yrbE4$, <i>Km^R</i>	Este trabajo
pMV5900	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_5900</i> clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI/HindIII</i> y empleado en la complementación del mutante $\Delta 5900$, <i>Km^R</i>	Este trabajo
pMV5899	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_5899</i> clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI/HindIII</i> y empleado en la complementación del mutante $\Delta 5899$, <i>Km^R</i>	Este trabajo
pMV5898	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_5898</i> clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI/HindIII</i> y empleado en la complementación del mutante $\Delta 5898$, <i>Km^R</i>	Este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pMV5897	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_5897</i> clonado entre las dianas de restricción <i>HindIII/ClaI</i> y empleado en la complementación del mutante $\Delta 5897$, Km^R	Este trabajo
pMV5896	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_5896</i> clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI/HindIII</i> y empleado en la complementación del mutante $\Delta 5896$, Km^R	Este trabajo
pMV5895	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_5895</i> clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI/HindIII</i> y empleado en la complementación del mutante $\Delta 5895$, Km^R	Este trabajo
pMV5894	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_5894</i> clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI/HindIII</i> y empleado en la complementación del mutante $\Delta 5894$, Km^R	Este trabajo
pMV5893	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_5893</i> clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI/HindIII</i> y empleado en la complementación del mutante $\Delta 5893$, Km^R	Este trabajo
pDO23A	Vector donador que contiene las regiones <i>attB23</i> que permiten el clonaje de productos de PCR con las secuencias <i>attB23</i> mediante el sistema Gateway, Cm^R , Ap^R	Invitrogen
pDO_RBSATPasa	Vector donador que contiene la construcción RBS+ <i>MSMEG_1366</i> clonada mediante las secuencias <i>attB23</i> a través del sistema Gateway, Cm^R , Ap^R	Este trabajo
pDO_FLAGATPasa	Vector donador que contiene la construcción RBS+FLAG+ <i>MSMEG_1366</i> clonada mediante las secuencias <i>attB23</i> a través del sistema Gateway, Cm^R , Ap^R	Este trabajo
pDOATPasa	Vector donador que contiene el gen <i>MSMEG_1366</i> clonado mediante las secuencias <i>attB23</i> a través del sistema Gateway, Cm^R , Ap^R	Este trabajo
pDOATPasa322	Vector donador que contiene el gen <i>MSMEG_1366</i> truncado a los 322 aa y clonado mediante las secuencias <i>attB23</i> a través del sistema Gateway, Cm^R , Ap^R	Este trabajo
pDOATPasa292	Vector donador que contiene el gen <i>MSMEG_1366</i> truncado a los 292 aa y clonado mediante las secuencias <i>attB23</i> a través del sistema Gateway, Cm^R , Ap^R	Este trabajo
pDOATPasa258	Vector donador que contiene el gen <i>MSMEG_1366</i> truncado a los 258 aa y clonado mediante las secuencias <i>attB23</i> a través del sistema Gateway, Cm^R , Ap^R	Este trabajo
pEN41 -P46	Vector de entrada <i>attB41</i> del sistema Gateway Multisite que contiene las secuencias: <i>attB4</i> -promotor P46- <i>attB1</i> , Ap^R	Lab. C.M. Sassetti
pEN12A-Venus	Vector de entrada <i>attB12</i> del sistema Gateway Multisite que contiene las secuencias <i>attB1</i> -RBS-ATG-6xHis-FLAG-sitio TEV-Gli-mVenus- <i>attB2</i> , Ap^R	Lab. C.M. Sassetti
pDE43-MEK	Vector de expresión <i>attB43</i> del sistema Gateway Multisite, Km^R	Invitrogen
MEKVenus_ATPasa	Vector de expresión que contiene el gen <i>MSMEG_1366</i> bajo el promotor P46 marcado en el extremo N-terminal con el epítipo FLAG y la proteína fluorescente Venus, Km^R	Este trabajo
MEKVenus_ATPasa322	Vector de expresión que contiene el gen <i>MSMEG_1366</i> truncado a los 322 aa bajo el promotor P46 marcado en el extremo N-terminal con el epítipo FLAG y la proteína fluorescente Venus, Km^R	Este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
MEKVenus_ATPasa292	Vector de expresión que contiene el gen <i>MSMEG_1366</i> truncado a los 292 aa bajo el promotor <i>P46</i> marcado en el extremo N-terminal con el epítipo FLAG y la proteína fluorescente Venus, <i>Km^R</i>	Este trabajo
MEKVenus_ATPasa258	Vector de expresión que contiene el gen <i>MSMEG_1366</i> truncado a los 258 aa bajo el promotor <i>P46</i> marcado en el extremo N-terminal con el epítipo FLAG y la proteína fluorescente Venus, <i>Km^R</i>	Este trabajo
pET29a(+)	Vector de clonación e hiperexpresión, <i>Km^R</i> , <i>oriColE1</i>	Novagen
pET5228	pET29a que contiene el gen <i>MSMEG_5228</i> clonado entre las dianas de restricción <i>NdeI/HindIII</i> , <i>Km^R</i>	Este trabajo
pTipQC1	Vector hiperexpresión <i>P_{tipA}</i> , <i>Cm^R</i> , <i>repAB</i> (pRE2895), MCS tipo 1	Nakashima <i>et al.</i> , 2004
pTip5228	pTipQC1 que contiene el gen <i>MSMEG_5228</i> clonado entre las dianas de restricción <i>NdeI/HindIII</i> , <i>Cm^R</i>	Este trabajo
pCGL0482	Vector bifuncional <i>E. coli/C. glutamicum</i> con el promotor PS1 (modificado del plásmido pCGL482), <i>Cm^R</i>	Peyret <i>et al.</i> , 1993
pCGL_DA	pCGL0482 que contiene los genes <i>MSMEG_1366-MSMEG_5228</i> clonados entre las dianas <i>XhoI/AatII</i> , <i>Cm^R</i>	Este trabajo
pECXK-99E	Vector bifuncional <i>E. coli/C. glutamicum</i> que contiene el gen <i>lacI^q</i> , <i>Km^R</i>	Kirchner and Tauch, 2003
pECmce4	pECXK-99E que contiene el operón <i>mce4</i> completo clonado en fase tras el promotor, <i>Km^R</i>	Este trabajo

Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este trabajo. Las secuencias subrayadas corresponden a las dianas de restricción incluidas para permitir su clonación. Entre paréntesis se indican las dianas empleadas para la clonación.

Oligonucleótido	Secuencia 5' 3'	Utilización
UP1366_F UP1366_R	G <u>ACTAGT</u> GCCAAAGCTGTCCACCGAGG GCTCTAGACCGAAAGACTTGCTCAACCC	Amplificación del fragmento UP1366 para la construcción del mutante Δ1366 (<i>SpeI/XbaI</i>)
DOWN1366_F DOWN1366_R	GCTCTAGAGTGAGTTTGCCGCGATCAGG (<i>XbaI</i>) ATTTCGCGCCGCCGTCTGAACGTCGAGCAGCC (<i>NotI</i>)	Amplificación del fragmento DOWN1366 para la construcción del mutante Δ1366 (<i>XbaI/NotI</i>)
pMV1366_F pMV1366_R	C <u>GGAATTC</u> TGACCTAAGGAGGTGAATATGGGCGTCCAAATCGA C CGAAGCTTAACTACGCCTGCTTGGG	Amplificación del gen <i>MSMEG_1366</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI/HindIII</i>)
attB2-RBS-1366-For attB3-1366-end	GGGGACAGCTTTCTTGACAAAGTGGACAGAAAGGAGGAAGGA ATGGGCGTCCAAATCGACGTG GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTCATCATGCACGCACCT CCGTCATC	Clonaje de RBS+ <i>MSMEG_1366</i> en el plásmido pDO23A mediante el sistema de clonación Gateway Multisite
attB2-FLAG-1366-For attB3-1366-end	GGGGACAGCTTTCTTGACAAAGTGGACAGAAAGGAGGAAGGA ATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGGCGTCCAAATCGACG TGACG GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTCATCATGCACGCACCT CCGTCATC	Clonaje de RBS+FLAG+ <i>MSMEG_1366</i> en el plásmido pDO23A. Usada con el oligo attB3-1366-end
attB2-1366-For attB3-1366-end	GGGGACAGCTTTCTTGACAAAGTGGACATGGGCGTCCAAATC GACGTG GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTCATCATGCACGCACCT CCGTCATC	Clonaje de FLAG+Venus+ <i>MSMEG_1366</i> en el plásmido pDO23A mediante el sistema de clonación Gateway Multisite
attB2-1366-For attB3-1366-322aa-rev	GGGGACAGCTTTCTTGACAAAGTGGACATGGGCGTCCAAATC GACGTG GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTCATCTCTCGAGGA TCGCGGCGCTG	Clonaje de FLAG+Venus+ <i>MSMEG_1366</i> (truncada a los 322 aa) en el plásmido pDO23A mediante el sistema de clonación Gateway Multisite
attB2-1366-For attB3-1366-292aa-rev	GGGGACAGCTTTCTTGACAAAGTGGACATGGGCGTCCAAATC GACGTG GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTCATCAGGGCATACCC GGGGTGGCCT	Clonaje de FLAG+Venus+ <i>MSMEG_1366</i> (truncada a los 292 aa) en el plásmido pDO23A mediante el sistema de clonación Gateway Multisite
attB2-1366-For attB3-1366-258aa-rev	GGGGACAGCTTTCTTGACAAAGTGGACATGGGCGTCCAAATC GACGTG GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTCATCAGGTGGCCTCGT CCTTCTCC	Clonaje de FLAG+Venus+ <i>MSMEG_1366</i> (truncada a los 258 aa) en el plásmido pDO23A mediante el sistema de clonación Gateway Multisite
UP5901_F UP5901_R	GCTCTAGACCCCAAATGAACGGAGCTGAGG GG <u>ACTAGT</u> GAAACCATCATCGCGCCTCCC	Amplificación del fragmento UP5901 para la construcción del mutante ΔyrbE4B (<i>XbaI/SpeI</i>)
DOWN5901_F DOWN5901_R	GG <u>ACTAGT</u> AACACGATGTGCAACGGAACGC CGAGCTCCACCGCGCCTTCGAGAAGTC	Amplificación del fragmento DOWN5901 para la construcción del mutante ΔyrbE4B (<i>SpeI/SacI</i>)
pMV5901_F pMV5901_R	C <u>GGAATTC</u> TGACCTAAGGAGGTGAATATTGCGCAAAAAAGAGA AGCC CGAAGCTTCTACCCCGAGAGGTTGAAGTTG	Amplificación del gen <i>MSMEG_5901</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI/HindIII</i>)
UPyrbE4_F UPyrbE4_R	G <u>ACTAGT</u> GGTGGTCAAGCCCACTACGG GCTCTAGACCTCAGTCCGTTTCATTTGGG	Amplificación del fragmento UPyrbE4 para la construcción del mutante ΔyrbE4 (<i>SpeI/XbaI</i>)
DOWNyrbE4_F DOWNyrbE4_R	GCTCTAGAAACACGATGTGCAACGGAACGC GCGAGCTCGTGTGAGACCCGCAAGCGTC	Amplificación del fragmento DOWNyrbE4 para la construcción del mutante ΔyrbE4 (<i>XbaI/SacI</i>)
pMVyrbE4_F pMVyrbE4_R	C <u>GGAATTC</u> TGACCTAAGGAGGTGAATATTGATCGAACAGCTTG CGGTT CGAAGCTTCTACCCCGAGAGGTTGAAGTTGC	Amplificación de los genes <i>MSMEG_yrbE4</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI/HindIII</i>)
UP5900_F UP5900_R	GACTAGTGCAGGCACTGTTCTACGGCG GCTCTAGACGTGTTCTACCCCGAGAGGTTG	Amplificación del fragmento UP5900 para la construcción del mutante Δmce4A (<i>SpeI/XbaI</i>)
DOWN5900_F DOWN5900_R	GCTCTAGAATGCACCGCGACAGGACCA GGGAGCTCTGTTGAGGTTGGCGATGACGT	Amplificación del fragmento DOWN5900 para la construcción del mutante Δmce4A (<i>XbaI/SacI</i>)
pMV5900_F pMV5900_R	CGGAATTCTGACCTAAGGAGGTGAATATGTGCAACGGAACG CCA CGAAGCTTCTAGAAGTCGTCCCTTTCCGC	Amplificación del gen <i>MSMEG_5900</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI/HindIII</i>)
pJQ200x dir XylE pJQ200x inv XylE int	TTGATGTTACCCGAGAGCTTG TCACTCACGGCAAGACCATC	Comprobación de las construcciones realizadas en el plásmido pJQ200x
pMV261_F pMV261_R	GGTTTCATCCCGATCCGGAG GTTTTATTTGATGCCTGGCAGTCG	Comprobación de las construcciones realizadas en el plásmido pMV261
5899_F1 5899_R1	TAGATGCACCGCGACAGGACCATGCTCAAGGTCGGCATCTTCA CCATGGTGATGCGCTCTAGAACTAGTGGATCC TCGTCGCGCAGACTAGCCATTCTCCGAGCACCTCCCCTGGACG GGTCCGGCGGACCGCCGAATACTTCTAGACTCGAGGTACCG	Primera amplificación para la realización del mutante ΔMce4B mediante el sistema RecET
5899_F2 5899_R2	CGAGCTGCAGTTCGACGCGCCGCGACGCTGCAGTTCCTGTTCA ACGGCGCTTCGCGGAAAGGGACGACTTCTAGATGCACCGCGA CAGGAC AAGGACACCAAGCACCACCGCGTCAACGAGCAGATGCCGAAGA TCCCGGTCCGACGCTCTTGTGCTGCGCAGACTAGCCATTC	Segunda amplificación para la realización del mutante ΔMce4B mediante el sistema RecET
5899_5EXTF 5899_3EXTR 5899_DelF 5899_DelR	GATACCTATCCCGAGAGCCTG ACCTTGCCGACCGTGATACC ATCGGTGAAACTCAACCCGGAC CGGACCGAGCAGTAGAAGATGTTG	Comprobación de la generación del mutante ΔMce4B mediante el sistema RecET

Oligonucleótido	Secuencia 5' 3'	Utilización
5899_Nout	AGGTTCTCGTACCGCACCAC	Comprobación de la escisión del gen de resistencia a Higromicina en el mutante Δ Mce4B
5899_Cout	GTCATCGCCAACCTCAACACC	
pMV5899_F	CGGAATTTCTGACCTAAGGAGGTGAATCTAGATGCACCG	Amplificación del gen <i>MSMEG_5899</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI/HindIII</i>)
pMV5899_R	CGAAGCTTCGTCGCGCAGACTAGCCATTC	
5898_For1	AATGGCTAGTCTGCGCGACGACAAGACGCTGCGGACCG	Primera amplificación para la realización del mutante Δ Mce4C mediante el sistema RecET
5898_Rev1	GGATCTTCGGCATCCGCTCTAGAACTAGTGGATCC TCATGGCGACTTCGGCCTCACGATCGTGCCTCGGCGAT GTAGCCGCGCAGCATGTCTACTTCTAGACTCGAGGTACCG	
5898_For2	AACGGACCGGCAGGCAGCGACATATTGATTCCGTTCCGG	Segunda amplificación para la realización del mutante Δ Mce4C mediante el sistema RecET
5898_Rev2	CGGTCCGCCGGACCCGTCGAAGGGGAGGTGCTCGGAGA ATGGCTAGTCTGCGCGACG CACCAGCAGCAGCGCGGCCAGCGCAGGCGCACCCAGC GGCCGCGGTTTCGATGTGCAATTGCAATGTGTCATGGCGA CTTCGGCCTC	
5898_5ExtFor	GTCATCGCCAACCTCAACACC	Comprobación de la generación del mutante Δ Mce4C mediante el sistema RecET
5898_3ExtRev	TGCGTGAGCTGTTCTTGTACC	
5898_DelF	GTATCACGGTTCGGCAAGGTGTC	
5898_DelR	GGTGTCCAGCAACACTTCCGAG	
5898_Nout	ACCTTGGCGACCGTGATACC	Comprobación de la escisión del gen de resistencia a Higromicina en el mutante Δ Mce4C
5898_Cout	AACCTCGTGATGGACAACCTGC	
pMV5898_F	CGGAATTTCTGACCTAAGGAGGTGAAGAATGGCTAGTCT	Amplificación del gen <i>MSMEG_5898</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI/HindIII</i>)
pMV5898_R	GCGCGACG CGAAGCTTGAATGTGTCATGGCGACTTCG	
5897_For1	ATGACACATTTCGAATTTCGACATCGAACC GCGCCGCTG	Primera amplificación para la realización del mutante Δ Mce4D mediante el sistema RecET
5897_Rev1	GGTGCGCTCGCGCTGGCCGCGCGCTCTAGAACTAGTGG ATCC TTCCCTCGTACGGTGCATCCGCCCGCACCTCCGGGAG CCGGCGCGGGGCCCGCGCGCGCGGGTACTTCTAGA CTCGAGGTACCG	
5897_For2	ACAGCCTTGCCGACATGCTGCGCGGTACATCGCCGAGC	Segunda amplificación para la realización del mutante Δ Mce4D mediante el sistema RecET
5897_Rev2	GCACGATCGTGAGGCCGAAGTCGCCATGACACATTTCGA ATTCGACATCGAAC CCGCTGCCGATCGCCAGGGTGCGCACCCCCAGGCGGGT TCCCTTACGTGCAAGGCTTGTCTTCGATTTCCTTCGT ACGGTCGTCATCC	
5897_5ExtFor	AACCTCGTGATGGACAACCTGC	Comprobación de la generación del mutante Δ Mce4D mediante el sistema RecET
5897_3ExtRev	CCTTCTGGTGGTTTGCCGAC	
5897_DelF	GTGGGACCAGGTCAAGGAACAG	
5897_DelR	GATCTGTCCCTGTAGGCCGTG	
5897_Nout	TGCGTGAGCTGTTCTTGTACC	Comprobación de la escisión del gen de resistencia a Higromicina en el mutante Δ Mce4D
5897_Cout	TCACGGCTACAAGGGACAG	
pMV5897_F	CGAAGCTTTGACCTAAGGAGGTGAATAATGACACATTC	Amplificación del gen <i>MSMEG_5897</i> para su clonación en pMV261 (<i>HindIII/Clal</i>)
pMV5897_R	GAATTCGACAT CGATCGATTGTCATCCGCCCGCAC	
5896_F1	CCTTGCAGCTAAGGGAACCCGCTGGGGGTGCGCACC	Primera amplificación para la realización del mutante Δ Mce4E mediante el sistema RecET
5896_R1	CTGGCGATCGGCACGCTCTAGAACTAGTGGATCC CGTGTCAGCCGGTCGATCATCTACGGCCCTCGTGCTGC GTCGCGGTCCCGGCTACTTCTAGACTCGAGGTACCG	
5896_F2	CGGCGCCGGGCCCGCGCCGCTCCCGGAGGTGCGGGC	Segunda amplificación para la realización del mutante Δ Mce4E mediante el sistema RecET
5896_R2	GGATGACGACCGTACGAGGAAATCGAAGGACAAGGC CTTGCAGCTAAGGGAACC AACTGCAGGTAGAACAGCGAGATGGCGCCACGGTGAA AACCCTGACGATCGCGAAGATCGTCAACTGCAGGCGTG TCAGCCGGTCGATC	
5896_5EXTF	TCACGGCTACAAGGGACAG	Comprobación de la generación del mutante Δ Mce4E mediante el sistema RecET
5896_3EXTR	GGATGGACGTGTTGCTGTTGAG	
5896_DelF	GTGATGATCGACGACGTGACC	
5896_DelR	CGTGAACACCGATTTCGCTG	
5896_Nout	CCTTCTGGTGGTTTGCCGAC	Comprobación de la escisión del gen de resistencia a Higromicina en el mutante Δ Mce4E
5896_Cout	TCAAGGACCTGTACGCGGTG	
pMV5896_F	CGGAATTTCTGACCTAAGGAGGTGAACGGGTGCGCACC	Amplificación del gen <i>MSMEG_5896</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI/HindIII</i>)
pMV5896_R	TGGC CGAAGCTTCTACGGCCCTCGTGCTG	
5895_For1	ATGATCGACCGGTGACACGCTGCAGTTGACGATCTTC	Primera amplificación para la realización del mutante Δ Mce4F mediante el sistema RecET
5895_Rev1	GCGATCGTACGCGCTCTAGAACTAGTGGATCC TCAAGCCTGCCTTGGATCCAGCATCAGGTCTACCCAGGT CTCCGCGGTGCGATCGCATCTACTTCTAGACTCGAGGT ACCG	

Oligonucleótido	Secuencia 5' 3'	Utilización
5895_For2	CCAACCTGTCCGGGCAGGCCGCCACCGTTCAAGATCCCGC CGGGGACCGCGACGCAGCACGAGGGGCCGTAGATGATCGAC CGGCTGACACG	Segunda amplificación para la realización del mutante ΔMce4F mediante el sistema RecET
5895_Rev2	CTGCTCACGGGCCCCGCCGGCGTGACGCACGACGGCGCACC GGCCTCGAACTGTCTAAGGCCGTTCTTTCGGTCATCAAGCCTG CCTTGGATCCAG	
5895_5ExtFor 5895_3ExtRev 5895_DeIF 5895_DeIR	TCAAGGACCTGTACGCGGTG TGGTGTCTCGGTGTAGCTG TGCTGCGTGAGACGTTCAAGG CGGGATCATCGGGAACCTTGTGG	Comprobación de la generación del mutante ΔMce4F mediante el sistema RecET
5895_Nout 5895_Cout	GGATGGACGTGTTGCTGTTGAG ATCGGCACCTACGATCAGCAC	
pMV5895_F pMV5895_R	CGGAATCTTGACCTAAGGAGGTGAATAATGATCGACCGGCTG ACACG CGAAGCTTGTCTTTCGGTCATCAAGCCTGC	Amplificación del gen <i>MSMEG_5895</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI/HindIII</i>)
5894_F1 5894_R1	GTGAGCAGTGAGCCGCTGGACACCATACCCCGGCGCCAGA GGTGCGGGCCGAGCGCTCTAGAACTAGTGGATCC GCTTGGAGCGCATCAGTTACCCCGTCCGGGTACTTCAGGTC GTACCCGGTCATGTGACTTCTAGACTCGAGGTACCG	Primera amplificación para la realización del mutante ΔMas4A mediante el sistema RecET
5894_F2 5894_R2	TGATGACCGAAAGAACGGCCTTAGACAGTTCGAGGCCGGTGC GCCGTCGTGCGTCACGCCCGCGGGGCCCGTGAGCAGTGAGC CGCTGG TACATCGCCCCACCCAGCGCGGACAGCGCGATGAAGGCCAC GGCAAGGACACCGACCGAGCGCCCGACGAGCTTGGAGCGCA TCAGTTACC	Segunda amplificación para la realización del mutante ΔMas4A mediante el sistema RecET
5894_5EXTF 5894_3EXTR 5894_DeIF 5894_DeIR	ATCGGCACCTACGATCAGCAC GGATAGGTCTCCATCAGGCTGC TGCGCCCAAGCTGAAGCC GCAGCCGGTACGGCTTGG	
5894_Nout 5894_Cout	TGGTGTCTCGGTGTAGCTG TTCAGCTACACGCAGGACACC	Comprobación de la generación del mutante ΔMas4A mediante el sistema RecET
pMV5894_F pMV5894_R	CGGAATCTTGACCTAAGGAGGTGAATAGTGAGCAGTGAGCC GCTGG CGAAGCTTAGCTTGGAGCGCATCAGTTACC	
5893_For1 5893_Rev1b	ATGCGCTCCAAGCTCGTCGGGCGCTGGTTCGTGTCCTTGCC GTGGCCTTCCGCTCTAGAACTAGTGGATCC GGCTGCCGTCGTAGAGCGGCTGGCGCGACTTGTCCGTGACCG TGCGGTTTCATGTACACCAGTACTTCTAGACTCGAGGTACCG	Primera amplificación para la realización del mutante ΔMas4B mediante el sistema RecET
5893_For2 5893_Rev2b	TGCGGGTGATCGTGCACGAGGACGACAACGGACACATGACC GGGTACGACCTGAAGTACCCGGACGGGGTAAGTATGTCGCT CCAAGCTCGTCG CTAGATCGGCTTGATGGCGTCGATCAGCCACTTGCCGTGAC CTTGCGGTACTCGACGCGCAGCCGGCTGCCGTCGTAGAGCG	
5893_5ExtFor 5893_3ExtRev 5893_DeIF2 5893_DeIR	TTCAGCTACACGCAGGACACC ACCTGGTCAACCCGCACG TGATGGAGACCTATCCGCTGC CTAGATCGGCTTGATGGCGTCG	Comprobación de la generación del mutante ΔMas4B mediante el sistema RecET
pMV5893_F pMV5893_R	CGGAATCTTGACCTAAGGAGGTGAATAATGCGCTCCAAGCTC GTC CGAAGCTTCTAGATCGGCTTGATGGCG	
Mce4op_F1 Mce4op_R1	TCCGCGCAATGCCACCCCGCCCAATGAACGGAGCTGAG GTTGATCGAACAGCGCTCTAGAACTAGTGGATCC GCGTGACGGGCGAGTCCACTCTGCGCCGAGTCCGACTCCG GGAGCTTCTAGTACTTCTAGACTCGAGGTACCG	Comprobación de la escisión del gen de resistencia a Higromicina en el mutante ΔMas4B
Mce4op_F2 Mce4op_R2	CACGTGAGCGCCATGTCAGACCCAGGGTGGGAAGGCCGCC GATCCGGTGGCCAGAATTTTCGCCGAGTGAATTCCGGCGA ATGCCACCC GCGCACGACGTCGACCGGTGGGACGCTATTCTCGACGCG CTGGCCGCCACCGCGAGACGGGCGACTCCGGCGTGACGGG CGAGTCCACTCC	

Oligonucleótido	Secuencia 5' 3'	Utilización
Mce4op_5EXTF	AGTCGTTTCGAGGGCCGTTAG	Comprobación de la generación del mutante Δ Mce4op mediante el sistema RecET
Mce4op_3EXTR	ACCTGGTCAACCCGCACG	
Mut5902-For (AAIDA)	GGAGCGCGCACGATCCGTGCGGCGATCGACGCCATGCGGGT GCTGG	Realización de las mutaciones puntuales EEIDA -> AAIDA en el gen <i>MSMEG_5902</i> del plásmido pMVyrbE4
Mut5902-RC (AAIDA)	CCAGCACCCGCATGGCGTCGATCGCCGCACGGATCGTGCGC GCTCC	
Mut5901-For (AAIDA)	GGCCATGCGGGTGGCCGCGGCGATCGACGCCGTGAATCCA TGG	Realización de las mutaciones puntuales EEIDA -> AAIDA en el gen <i>MSMEG_5901</i> del plásmido pMVyrbE4
Mut5901-RC (AAIDA)	CCATGGATTTCAGCGCGTCGATCGCCGCGCCACCCGCATG GCC	
5902-Int-For	TTCCGTTACACGTCCTGGTC	Secuenciación de la mutación AAIDA en el gen <i>MSMEG_5902</i>
5902-Int-Rev	TAACAGCCCACCAGACCTGC	
5901-Int-For	TACCTGCCCAACGCCTTCAC	Secuenciación de la mutación AAIDA en el gen <i>MSMEG_5901</i>
5901-Int-Rev	TGCAGGAACGACCACAGCAG	
2758int_F	CTTGAGGTGACCGACGATCTC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_2758</i> (131 pb) para análisis mediante qRT-PCR
2758int_R	GCATCAGCTTCTTCTTCCTCG	
1366int_F	CACCGACATCCTGCAGTGCTC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_1366</i> (159 pb) para análisis mediante qRT-PCR
1366int_R	CGGATTTTCGCTCTCGCTCTTC	
0134int_F	CAACAAGCCGAAGACACCGC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_0134</i> (128 pb) para análisis mediante qRT-PCR
0134int_R	GGACCGTGAGCTGAACCTTGTC	
5899int_F	GCGCTGGCCAACATGCTG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_5899</i> (97 pb) para análisis mediante qRT-PCR
5899int_R	CGGTGTTGAGGTTGGCGATG	
K99E-mce4_R	TCGAAGAACCCGCCGACGCGCCGGCCGGAACCGCAAGTT GTTGGATCAACATGGTCTGTTCTGTGTGAAATTGTTATCC	Amplificación del vector pEC-XK99E para su posterior clonaje con el operón <i>mce4</i> mediante el sistema de recombinación RecET
K99E-mce4_F	GGATGGCCAACCTCACCGTACTCGCCGTTAATGTGGCCGAC CTGGCGTTCAGCGCCGATGGTAGTGTGG	
lacIq_Cout	ACTGGAAGCGGGCAGTG	Comprobación de la construcción pEC- XK99E+mce4 tras la recombinación mediante el sistema RecET
Ptrc_F	CAAGGCGCACTCCCGTTC	
OtsA-Int_F	GCTGAGCACCAGGGCACC	
Per-Int_R	TTGTGGCCGACCTTGAAGAGC	
pET5228-F	CGCATATGGCTGACTCCACCACCGAC	Amplificación del gen <i>MSMEG_5228</i> para su clonación en pET29a (<i>NdeI/HindIII</i>)
pET5228_R	AAGCTTCGTGCTGCCCTGAACTAG	
pTipQC1_F	CGGGCTTGACCTCACGTCA	Comprobación de las construcciones realizadas en el plásmido pTipQC1
pTipQC1_R	GTGTTTGTGCAGGTTTCGCG	
pCGL5228_F	TATACTCGAGATGGCTGACTCCACCACCGACCTC	Amplificación del gen <i>MSMEG_5228</i> para su clonación en pCGL0482 (<i>XhoI/HpaI</i>)
pCGL5228_R	AATAGTTAACGCCGTGCTGCCCTGAAC	
pCGLATPasa_F	ACACGTTAACGAGAAGGAAACTTCATGGGCGTCCAAATCG ACGTG	Amplificación del gen <i>MSMEG_1366</i> para su clonación en pCGL0482 (<i>HpaI/AatII</i>)
pCGLATPasa_R	TTCTGACGTCTGCACGCACCTCCGTCATC	
pCGL5228-Int_F	GATTCATCCTTGCCGAGAGC	Comprobación de la construcción pCGL+ <i>MSMEG_5228</i>
pCGL482-Rev	AATGCCTGAGGCCAGTTTGC	
pCGLATPasa-Int_F	CAACGACGGGCACAAGTTCC	Comprobación de la construcción pCGL+ <i>MSMEG_1366</i>
pCGL482-Rev	AATGCCTGAGGCCAGTTTGC	

2. Medios y condiciones de cultivo

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121 °C y 1 atm de presión, o mediante filtración utilizando filtros estériles Millipore de 0.2 µm de diámetro.

Los antibióticos se prepararon en soluciones acuosas a 1000 mg mL⁻¹, a excepción de la ampicilina, que se preparó a 25 mg mL⁻¹. Las soluciones preparadas se esterilizaron por filtración y se conservaron a -20 °C.

2.1. Medios y condiciones de cultivo empleados para *E. coli*

Los medios ricos utilizados para cultivar las células de *E. coli* fueron el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 2001) o el medio Terrific Broth (TB) (Tartoff *et al.*, 1987) (12 g L⁻¹ de triptona, 24 g L⁻¹ de extracto de levadura, 12.5 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 2.3 g L⁻¹ de KH₂PO₄ y suplementado con 0.4 % de glicerol y 2 g L⁻¹ de bactopectona). Los cultivos en medio sólido se realizaron con medio LB al que se añadió Bacto Agar (Pronadisa) al 1.5% (p/v). En caso de ser necesario se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Ap) (100 µg mL⁻¹), kanamicina (Km) (50 µg mL⁻¹).

Las células de *E. coli* se cultivaron a 37 °C. Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en un agitador orbital a 250 rpm. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm (DO₆₀₀) empleando un espectrofotómetro UVMMini-1240 (Shimadzu).

2.2. Medios de cultivo y condiciones empleados para *R. erythropolis* IGTS8

Los medios ricos utilizados para cultivar las células de *R. erythropolis* IGTS8 fueron el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 2001). Los cultivos en medio sólido se realizaron con medio LB al que se añadió Bacto Agar (Pronadisa) al 1.5 % (p/v). En caso de ser necesario se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones finales: Ap (100 µg mL⁻¹) (Sigma) y Km (50 µg mL⁻¹) (Sigma).

Las células de *R. erythropolis* IGTS8 se cultivaron a 30 °C. Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en un agitador orbital a 250 rpm. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm (DO₆₀₀) empleando un espectrofotómetro UVMMini-1240 (Shimadzu).

2.3. Medios de cultivo y condiciones de empleados para *M. smegmatis*

Para el cultivo de micobacterias se utilizaron los medios ricos Bacto Middlebrook 7H10 Agar (Difco) y LB con 1.5% de agar como medios sólidos, y Middlebrook 7H9 Broth (Difco) y LB como medios líquidos. Los medios Bacto Middlebrook 7H9 Broth y 7H10 Agar fueron suplementados con 0.2% de glicerol (v/v) (Merck) y 10% (v/v) de Middlebrook ADC Enrichment (Difco) (fórmula aproximada por 1 L de agua: NaCl (8.5 g), albúmina bovina (Fracción V) (50 g), glucosa (20 g), catalasa (0.03 g)). En todos los cultivos en medio líquido se

añadió 0.05% (v/v) de Tween80 (Sigma) previamente autoclavado para evitar la agregación de las células.

Para los cultivos líquidos en medio mínimo se empleó como base el medio 7H9 sin suplementos (sin glicerol y sin ADC) y se añadió glicerol 18 mM, colesterol 1.8 mM (Sigma) o colesteno 1.8 mM (Sigma) como fuente de carbono según correspondiera. En estos casos, como los esteroides se prepararon en tyloxapol (Sigma) que actúa como un detergente, no fue necesario añadir Tween80. La concentración final de tyloxapol en el medio de cultivo siempre fue inferior a 3.6% (v/v).

En caso de ser necesario se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones: Km (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), gentamicina (Gm) (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma).

Las células de *M. smegmatis* se cultivaron a 37 °C. Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en un agitador orbital a 250 rpm. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm (DO_{600}) empleando un espectrofotómetro UVMini-1240 (Shimadzu).

2.4. Medios y condiciones de cultivo empleados para *C. glutamicum*

Para el cultivo de corinebacterias se utilizaron los medios ricos Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) como medio sólido y Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) como medio líquido. Las células de *C. glutamicum* se cultivaron a 30 °C. Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en un agitador orbital a 250 rpm. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm (DO_{600}) empleando un espectrofotómetro UVMini-1240 (Shimadzu). En caso de ser necesario se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones: cloranfenicol (Cm) (6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma) y Km (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma).

2.4.1 Ensayos de biotransformación de esteroides con células en reposo (*resting cells*) de *C. glutamicum*

Para la obtención de la biomasa empleada en la biotransformación se cultivó un volumen total de 200 mL de células de *C. glutamicum* crecidas en medio Tryptic Soy Broth (Difco) durante 30 h a 30 °C y 250 rpm en matraz de 1 L desde una $\text{DO}_{600} = 0.05$, empleando un preinóculo de 48 h crecido en el mismo medio a 30 °C y 250 rpm. En caso de ser necesario se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones: cloranfenicol (Cm) (6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma). Cuando las células alcanzan la fase exponencial tardía ($\text{DO}_{600} = 6-7$) son recogidas mediante centrifugación (10 min, 4000 rpm) en una microcentrífuga MiniSpin de Eppendorf y lavadas dos veces con solución salina al 85%.

Para los ensayos de biotransformación de esteroides con células en reposo de *C. glutamicum* se empleó tampón Hepes 25 mM pH 8, al que se le añadieron los esteroides a una concentración final de 2 mM, desde una solución de esteroide preparada a una concentración de 5 mM en 10% de tyloxapol, siendo por tanto la concentración final del mismo de 4%. Las células se mantuvieron en este medio en agitación a 30 °C y se recogieron alícuotas del mismo a diferentes tiempos para su posterior análisis.

2.5. Protocolo de disolución de esteroides

Los esteroides son moléculas altamente hidrofóbicas, por lo que es necesario disolverlas de manera especial para poder seguir por turbidimetría el crecimiento de los cultivos en medio líquido.

Para los cultivos en medio mínimo en los que se emplearon los esteroides como única fuente de carbono, éstos se disolvieron en 10% (v/v) de tyloxapol a una concentración de 5 mM. Para conseguir la disolución completa de los esteroides, las soluciones se sonicaron en un baño a 80 °C durante aproximadamente 30 min (o hasta conseguir la completa disolución) y posteriormente fueron autoclavadas.

2.6. Conservación de las cepas bacterianas

Durante periodos inferiores a un mes las cepas se conservaron a 4 °C en placas de LB, TSA o 7H10. Para su conservación a largo plazo las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en LB con los antibióticos correspondientes y congeladas a -80 °C con 20% (v/v) de glicerol. En el caso de las cepas de *R. erythropolis*, se cultivaron en medio LB con los antibióticos correspondientes y se congelaron a -80 °C con 50% (v/v) de glicerol. Las cepas de *M. smegmatis* se cultivaron en medio 7H9/ADC/Tween con los antibióticos correspondientes y congeladas a -80 °C con 50% (v/v) de glicerol. Por último, las cepas de *C. glutamicum* fueron cultivadas en TSB con los antibióticos correspondientes y congeladas a -80 °C con 20% (v/v) de glicerol.

3. Experimentos de transferencia genética

3.1. Transformación de células de *E. coli*

Las células de *E. coli* fueron modificadas genéticamente por transformación tras hacerlas competentes mediante el método de RbCl y choque térmico (Sambrook *et al.*, 2001).

3.2. Transformación de células de *M. smegmatis*

3.2.1. Preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis*

La preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis* se llevó a cabo según un protocolo descrito previamente (Parish *et al.*, 1998). En primer lugar, se siembra una colonia de la cepa de micobacteria correspondiente en 10 mL de medio 7H9-glicerol-ADC conteniendo 0.05% (v/v) de Tween80 y se incuba a 37 °C hasta alcanzar la fase estacionaria (aproximadamente 30 horas en *M. smegmatis*). Con 2 mL de este cultivo se inoculan 200 mL de medio 7H9-glicerol-ADC conteniendo 0.05 % (v/v) de Tween80 y se incuba en agitación a 37 °C hasta una $DO_{600} = 0.8-1.0$ (18 h de cultivo aproximadamente). A continuación el cultivo se incuba 1.5 h a 4 °C y se centrifuga en 4 tubos tipo Falcon de 50 mL a 3000 x g a 4 °C durante 10 min. Una vez decantado el sobrenadante, se resuspenden las células en 200 mL de una solución de glicerol 10% (v/v) con Tween80 al 0.05% (v/v) enfriada a 4 °C. Tanto en este paso como en las etapas posteriores se resuspenden las células volteando el recipiente, nunca con agitador, ni pipeteando. Seguidamente se centrifuga la suspensión de células, se retira el sobrenadante y se resuspenden de nuevo en 100 mL de la misma solución glicerol-Tween80. Tras un tercer paso de centrifugación se añaden 25 mL de glicerol 10% (v/v) con Tween80 al 0.05%. Las células se resuspenden volteando y se dejan reposar para sedimentar los agregados. Posteriormente se toma la suspensión sin los agregados con una pipeta estéril. La suspensión se lleva a un tubo tipo Falcon limpio enfriado a 4 °C y se centrifuga. Finalmente se retira el sobrenadante, se resuspenden las células en 1.5 mL de glicerol-Tween80 a 4 °C y se reparten en alícuotas de 200 µL que se guardan a -80 °C hasta su uso posterior.

3.2.2. Transformación de células de *M. smegmatis* mediante electroporación

A una alícuota de 200 µL de células electrocompetentes se añade el ADN con el que se va a transformar (en el caso de plásmidos se recomienda transformar con 1 µg de ADN). Esta mezcla se pasa a una cubeta de electroporación (Cell Projects), y se incuba durante 10 min a 4 °C. A continuación se electropora en un electroporador Gene Pulser (Biorad) a 2.5 Kv, 25 µF y 1000 Ω y posteriormente la cubeta se incuba a 4 °C otros 10 min. Posteriormente se añade 1 mL de medio 7H9-ADC-Tween a la cubeta y el líquido se pasa a un tubo tipo Falcon de 15 mL. Las células se incuban 4 h a 37 °C en agitación antes de sembrarlas en medio sólido 7H10-ADC con los antibióticos necesarios.

3.3. Transformación de células de *R. erythropolis*

3.3.1. Preparación de células electrocompetentes de *R. erythropolis*

Las células electrocompetentes de *R. erythropolis* se preparan a partir de un preinóculo de una sola colonia de la cepa en 10 mL de medio LB que se incuba a 30 °C hasta alcanzar la fase estacionaria (aproximadamente 20 horas). Con 1 mL de este cultivo se inoculan 100 mL de medio LB y se incuba en agitación a 30 °C hasta una DO₆₀₀ de 0.6-0.8. A continuación el cultivo se mantiene a 4 °C durante 15-30 min y se centrifuga en 2 tubos tipo Falcon de 50 mL a 3000 x g a 4 °C durante 10 min. Una vez decantado el sobrenadante, se resuspenden las células en 50 mL de agua estéril a 4 °C. Seguidamente se centrifuga la suspensión de células, se retira el sobrenadante resuspendiéndose de nuevo en 2 mL de una solución de glicerol 10% (v/v) a 4 °C y se reparten en alícuotas de 50 µL que se guardan a -80 °C hasta su uso posterior. Las células se mantienen en estas condiciones hasta 7 meses.

3.3.2. Transformación de células de *R. erythropolis* mediante electroporación

A una alícuota de 50 µL de células electrocompetentes se añade el ADN con el que se va a transformar (en el caso de plásmidos se recomienda transformar con 1 µg de ADN). Esta mezcla se pasa a una cubeta de electroporación (Cell Projects), y se incuba durante 1-2 min a 4 °C. A continuación se electropora en un electroporador Gene Pulser (Biorad) a 2.5 Kv, 25 µF y 200 Ω. Inmediatamente después se añade 1 mL de medio LB a la cubeta y el líquido se pasa a un tubo tipo Falcon de 15 mL. Las células se incuban 4 h a 30 °C en agitación antes de sembrarlas en medio sólido LB con los antibióticos necesarios.

3.4. Transformación de células de *C. glutamicum*

3.4.1. Preparación de células electrocompetentes de *C. glutamicum*

Se parte de un preinóculo en fase estacionaria (aproximadamente 30 h). (10 mL en matraz de 100 mL) cultivado en medio TSB. Se inocula medio fresco a una DO₆₀₀ de 0.01 (200 mL de TSB en matraz de 1 L) y se incuba en agitación (200 rpm) a 30 °C hasta una DO₆₀₀ de 1.2-1.5 (6 h de cultivo aproximadamente). A continuación el cultivo se mantiene 30 min a 4 °C y se centrifuga en 4 tubos de tipo Falcon de 50 mL a 3000 x g a 4 °C durante 10 min. Una vez decantado el sobrenadante, se resuspenden las células volteando en 200 mL de una solución de glicerol 10% (v/v) enfriada a 4 °C. Seguidamente se centrifuga la suspensión de células, se retira el sobrenadante y se resuspenden de nuevo en 100 mL de la misma solución. Tras un tercer paso de centrifugación se añaden 25 mL glicerol 10% (v/v). Las células se resuspenden volteando y se dejan reposar para sedimentar los agregados. Posteriormente se toma la suspensión sin los agregados con una pipeta estéril. La suspensión se lleva a un tubo cónico limpio enfriado a 4 °C y se centrifuga. Finalmente se retira el sobrenadante, las células se resuspenden en 2 mL de glicerol 10% (v/v) y se reparten en alícuotas de 50 µL que se guardan a -80 °C hasta su uso.

3.4.2. Transformación de células de *C. glutamicum* mediante electroporación

A una alícuota de 50 μ l de células electrocompetentes se añade 1 μ g del ADN con que se va a transformar. Esta mezcla se pasa a una cubeta de electroporación (*Cell Projects*), y se incuba durante 10 min a 4 °C. A continuación se electropora en un electroporador *Gene Pulser* (Biorad) a 2.5 Kv, 25 μ F y 200 Ω . Posteriormente se añade 1 mL de medio TSB a la cubeta pasando todo el contenido a un tubo de tipo Falcon de 15 mL. Las células se incuban 1 h a 30 °C en agitación (200 rpm) antes de sembrarlas en medio sólido TSA con los antibióticos necesarios.

4. Técnicas de manipulación de ADN

La manipulación del ADN así como la mayor parte de las técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo fueron aplicadas esencialmente tal y como describen Sambrook y Russell (2001). Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por New England Biolabs y Takara. La ADN polimerasa I y la *Pfu* polimerasa fueron suministradas por Biotools B. M. Labs. Todas las enzimas se emplearon atendiendo a las especificaciones de las diferentes casas comerciales. Los fragmentos de ADN se purificaron mediante los kits *GeneClean Turbo* (Q-BIOgene) o *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

4.1. Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar los fragmentos de ADN se utilizaron geles de agarosa al 0.7% o al 1.5 % en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM (Sigma), EDTA 2 mM (Sigma), pH 8.1), utilizando el mismo tampón como electrolito. A las muestras se les añadió ¼ de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 30% (p/v) (Sigma), azul de bromofenol al 0.2% (p/v) (Sigma), xilencianol al 0.2% (p/v) (Sigma) y EDTA 40 mM pH 8.0. La electroforesis se realizó a 100 V durante 15-20 min y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con GEL-RED y los fragmentos de ADN se visualizaron con radiación ultravioleta en un transiluminador. Como marcadores de tamaño se utilizaron el ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción *BstEII* (Amersham), y la forma replicativa del fago Φ X174 digerida con *HaeIII* (New England Biolabs).

4.2. Extracción ADN cromosómico de *M. smegmatis*

Para realizar la extracción de ADN cromosómico de *M. smegmatis* se emplea la biomasa procedente de un cultivo de 10 ml en medio 7H9-ADC-Tween. Las células se resuspenden en 400 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5) y se incuban a 80 °C durante 20 min. Se dejan enfriar a temperatura ambiente y se añade 50 μ l de lisozima (10 mg

mL⁻¹), se mezcla con agitación y se deja de 1 a 12 h a 37 °C. A continuación se añaden 75 µL de SDS al 10 % conteniendo proteinasa K (10 mg mL⁻¹), se mezcla con vórtex y se incuba 10 min a 65 °C. Posteriormente se añaden 100 µL de NaCl 5 M y 100 µL de CTAB/NaCl precalentados a 65 °C y se incuba durante 10 min a 65 °C. Seguidamente se añaden 750 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcla con agitación y se centrifuga 5 min a 14000 x g. La solución acuosa se toma con pipeta, se transfiere a un tubo eppendorf y se añade un volumen equivalente de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1), se mezcla con agitación y se centrifuga 5 min a 14000 x g. La fase acuosa se vuelve a tomar con pipeta y se transfiere a un eppendorf donde el ADN se precipita con 0.6 volúmenes de isopropanol y se mantiene 30 min a temperatura ambiente. Finalmente el ADN se centrifuga 15 min a 14000 x g a 4 °C, se lava con etanol al 70%, se centrifuga 2 min a 14000 x g y se seca el precipitado que posteriormente se resuspende en 40-100 µL de TE.

4.3. Aislamiento de ADN plasmídico en *E.coli* y *M. smegmatis*

La extracción de ADN plasmídico de células *E. coli* se llevó a cabo empleando el sistema *High Pure Plasmid Purification Kit* (Roche), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

El aislamiento de ADN plasmídico de *M. smegmatis* se realiza para comprobar si las células han adquirido el plásmido con el que fueron transformadas. Para ello se realiza una extracción de ADN de la cepa que se desea comprobar tal y como se explica en el apartado anterior. El ADN total extraído, que contendrá tanto el ADN cromosómico como el ADN plasmídico, se emplea para transformar mediante choque térmico células de *E. coli*. Las células transformadas se seleccionan y se realiza la extracción de ADN plasmídico para comprobar que dicho plásmido es el que se había transformado previamente en *M. smegmatis*.

4.4. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)

La amplificación del ADN se realizó en un equipo *Mastercycler Gradient* de Eppendorf y las enzimas que se emplearon fueron la ADN polimerasa I y la *Pfu* polimerasa, ambas proporcionadas por Biotools B. M. Labs. Las mezclas de reacción contenían 1.5 mM de MgCl₂, 0.25 mM de dNTPs, 5% de DMSO y 0.5 µM de cada uno de los oligonucleótidos empleados. Los productos amplificados se purificaron con el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) previamente a su uso.

4.4.1. PCR de colonia en *E. coli*

Una de las maneras de comprobar si las células de *E. coli* contienen el fragmento de ADN con el que han sido transformadas consiste en la amplificación mediante PCR de una

región de dicho fragmento empleando directamente células enteras. Para ello, una pequeña cantidad de biomasa de la colonia que se desea analizar se resuspende directamente en la mezcla de reacción de PCR y a continuación se lleva a cabo el protocolo de amplificación habitual.

4.4.2. PCR de colonia o de cultivo líquido en *M. smegmatis*, *R. erythropolis* y *C. glutamicum*.

Una manera rápida de comprobar si las células de *M. smegmatis*, *R. erythropolis* y *C. glutamicum* han incorporado una construcción (por ejemplo, cuando se construyen las cepas mutantes) consiste en la amplificación por PCR de una región de ADN incluida en dicha construcción. Esto puede realizarse a partir de una pequeña cantidad de biomasa de una colonia o a partir de la biomasa obtenida por centrifugación de 100 µL de un cultivo líquido en fase exponencial. La biomasa obtenida se resuspende en 50 µL de TE y se incuba durante 10 min a 80 °C. Posteriormente se añaden 5 µL de esta suspensión a 45 µL de mezcla de reacción de PCR y se somete al protocolo de amplificación habitual.

4.5. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN (SSAD) del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) (SECUGEN, S.L.) utilizando un secuenciador automático modelo ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). Para la reacción de secuenciación se utilizó el *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* de Applied Biosystems, y la ADN polimerasa AmpliTaq FS, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo mediante la técnica de PCR con un termociclador Gene Amp PCR System 2400 de Perkin-Elmer.

4.6. Construcción de mutantes por delección mediante el sistema pJQ200x de doble recombinación homóloga en *M. smegmatis*

La construcción de cepas mutantes en los genes *MSMEG_1366* (*mceG*), *MSMEG_5901* (*yrbE4B*) y *MSMEG_5901-MSMEG-5902* (*yrbE4*) se realizó mediante delección por doble recombinación homóloga. En primer lugar se amplificaron por PCR dos fragmentos de aproximadamente 600 pb, uno en posición 5' al gen a mutar (*UP1366_F/UP1366_R* en el caso del gen *MSMEG_1366*, *UP5901_F/UP5901_R* en el caso del gen *MSMEG_5901* y *UPyrbE4_F/UPyrbE4_R* en el caso de los genes *MSMEG_5901-MSMEG-5902*), y otro en posición 3' (*DOWN1366_F/DOWN1366_R* en el caso del gen *MSMEG_1366*, *DOWN5901_F/DOWN5901_R* en el caso del gen *MSMEG_5901* y *DOWNyrbE4_F/DOWNyrbE4_R* en el caso de los genes *MSMEG_5901/MSMEG_5902*). Los fragmentos UP y DOWN se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes para hacer sus extremos compatibles y posteriormente se incubaron con la T4 ADN ligasa durante 1

h. Los fragmentos UP-DOWN de cada gen se clonaron en el plásmido no replicativo en micobacterias pJQ200x (Jackson *et al.*, 2001). Este plásmido presenta como marcadores de selección el gen de resistencia a gentamicina, el gen *sacB*, que codifica una levansacarasa de *Bacillus subtilis* cuya expresión es letal para la bacteria en presencia de sacarosa, y el gen *xylE*, que codifica una catecol-2,3-dioxigenasa que en presencia de catecol produce el compuesto 2-hidroxi-mucónico semialdehído, caracterizado por una coloración amarilla. Los plásmidos resultantes pJQUD1366, pJQUD5901 y pJQUDyrbE4 fueron transformados en células de *M. smegmatis* mc²155 mediante electroporación y los transformantes se seleccionaron en placas de medio 7H10 con Gm (5 µg. mL⁻¹). Las colonias resistentes a gentamicina se replicaron en placas de 7H10-sacarosa 10% (p/v). Se seleccionaron las colonias resistentes a gentamicina, sensibles a sacarosa y que portaban el gen *xylE* (comprobado por la adquisición de coloración amarilla cuando se adiciona sobre la colonia entre 10-15 µL de catecol). Estas colonias han sufrido una recombinación simple y todo el vector está integrado en el cromosoma. Para forzar una segunda recombinación la colonia seleccionada se cultiva en 10 mL de medio 7H9 con gentamicina hasta una DO₆₀₀ aproximada de 0.8-0.9, momento en el cual se siembran 10 µL en una placa de 7H10 y otros 10 µL en una placa de 7H10 con 10% de sacarosa. En la placa con sacarosa se deben obtener alrededor de 10³ a 10⁴ colonias menos, lo que indica que ha tenido lugar la segunda recombinación.

Las colonias obtenidas en presencia de sacarosa se replicaron en placas de 7H10 con gentamicina y 7H10 con 10% de sacarosa. Aquellas colonias sensibles a gentamicina, que no portan el gen *xylE* y resistentes a sacarosa eran mutantes por recombinación doble. Los mutantes así obtenidos fueron analizados por PCR, empleando dos parejas de cebadores que dan lugar a fragmentos de diferente tamaño en función de que se trate de la cepa mutada o no: por un lado se empleó la pareja formada por el oligonucleótido UP_F (UP1366_F, UP5901_F o UPyrbE4_F) y el oligonucleótido reverso de cada gen (1366_R o 5901_R), y por otro lado la pareja formada por el oligonucleótido directo de cada gen (1366_F, 5901_F o 5902_F) y el DOWN_R (DOWN1366_R, DOWN5901 o DOWNyrbE4_R). Las cepas que presentaban los genes *MSMEG_1366*, *MSMEG_5901* y *MSMEG_yrbE4* delecionados se denominaron $\Delta 1366$, $\Delta 5901$ y $\Delta yrbE4$ respectivamente.

Para la construcción de la cepa doble mutante $\Delta kstR\Delta 1366$, el mutante simple $\Delta kstR$ fue transformado con el plásmido pJQ1366 y los transformantes fueron seleccionados de la misma manera que se ha comentado para los mutantes simples.

4.7. Construcción de mutantes por delección mediante el sistema RecET de recombinación homóloga en *M. smegmatis*

Hoy en día, el uso de técnicas de clonación y modificación genética basadas en enzimas de restricción siguen siendo ampliamente utilizadas en los laboratorios; sin embargo, cada vez

con más frecuencia están siendo empleados otros métodos mucho más eficientes, rápidos y menos costosos. Tal es el caso de la recombinación homóloga, una poderosa herramienta de ingeniería genética en la cual no se emplean enzimas de restricción ni ADN ligasas lo que permite reducir costes y tiempo de trabajo (Ellis *et al.*, 2001; Court *et al.*, 2002).

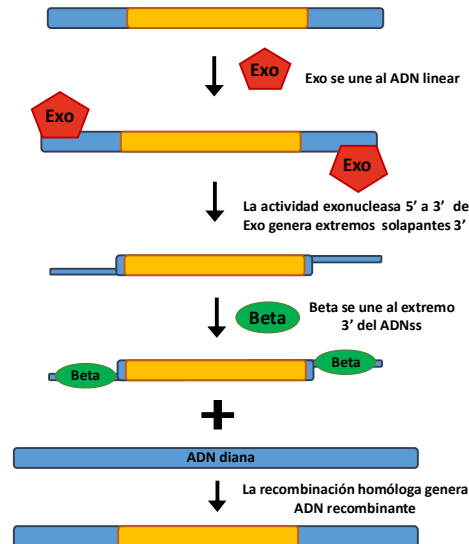


Figura 7. Resumen del Sistema de recombinación del bacteriófago λ usado para la recombinación homóloga en *E. coli*. La proteína Exo posee actividad exonucleasa de 5' a 3' sobre el ADN lineal de cadena doble, que acaba generando extremos 3' solapantes. La proteína Beta se une posteriormente a los extremos 3' solapantes (ADN de cadena simple) favoreciendo la hibridación de los mismos con las regiones homólogas del ADN diana y por tanto, la recombinación. La proteína Gam (no presente en el esquema) impide la degradación de los fragmentos de ADNcd lineares por la acción de la nucleasa RecBCD.

Este sistema se ha utilizado principalmente en *E. coli* como herramienta molecular y se basa en los genes de recombinación Red: *exo*, *bet* y *gam* (Court *et al.*, 2002; Sawitzke *et al.*, 2007) que se encuentran localizados dentro del operón P_L del fago λ . La proteína Exo del fago λ es una exonucleasa que reconoce extremos de ADN de cadena doble (ADNcd) o de cadena sencilla (ADNcs) degradando ADN lineal en dirección 5'-3' (Carter and Radding, 1971) para generar extremos 3' protuberantes (Fig. 7) (Ellis *et al.*, 2001; Subramanian *et al.*, 2003). Entonces Beta se une de manera estable a una cadena de ADNcs mayor a 35 nucleótidos en dirección 3'-5' (Muniyappa and Radding, 1986) protegiéndolo de la degradación de nucleasas. Posteriormente la proteína Beta promueve el apareamiento y alineación de regiones homólogas de ADNcs (Fig. 7). Por último, la proteína Gamma actúa bloqueando la actividad de nucleasas como RecBCD (Sawitzke *et al.*, 2007) o SbcCD (Kulkarni and Stahl, 1989) promoviendo que las secuencias de ADN exógeno sean más estables y se puedan integrar en regiones homólogas del genoma bacteriano, ya sea plásmido o cromosoma (Ellis *et al.*, 2001; Court *et al.*, 2002). Las

posibles aplicaciones moleculares de este sistema son enormes ya que se puede realizar prácticamente cualquier modificación en el genoma bacteriano, llevar a cabo la clonación de secuencias de ADN en cualquier vector sin el uso de enzimas de restricción y ligasas o incluso recuperar fragmentos de ADN cromosomal y clonarlos en vectores lineales por reparación de «gaps» o huecos.

Aunque el desarrollo de esta nueva tecnología en *E. coli* depende de las funciones Red del fago λ , esta función no es universal en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, lo que supone una importante limitación para las aplicaciones de la recombinación incentivando la búsqueda de alternativas y actividades análogas a los genes red de λ . Recientemente, van Kessel y Hatfull (2007) han desarrollado un sistema de recombinación en *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis* denominado sistema RecET basado en el micobacteriófago Che9c que posee proteínas homólogas a Exo y Beta abriendo el campo de la utilización de este sistema en el género *Mycobacterium* (van kessel *et al.*, 2008). De esta manera la proteína CH9c gp60 codifica una exonucleasa (5'-3') dependiente de ADNcd homóloga a Exo (Muyrers *et al.*, 2000) mientras que CH9c gp61 homóloga a Beta es una proteína que se une al ADNcs y promueve el alineamiento con regiones homólogas de ADN (Li *et al.*, 1998). Así, los genes del sistema λ red y RecET se han clonado en plásmidos con diversos orígenes de replicación y bajo la expresión de diferentes promotores inducibles para evitar la inestabilidad de los plásmidos, los reordenamientos genómicos y los efectos tóxicos de proteínas como Gamma (Datta *et al.*, 2006; Court *et al.*, 2002). Todos los plásmidos generados han convertido a estos sistemas de recombinación en una poderosa herramienta para generar inserciones, deleciones y mutaciones puntuales en cromosoma, plásmidos o BAC (Sharan S.K. *et al.*, 2009).

4.7.1. Construcción de mutantes por inserción mediante el sistema RecET de recombinación homóloga en *M. smegmatis*

La construcción de las cepas mutantes en los genes *MSMEG_5901* (yrbE4B), *MSMEG_5900* (mce4A), *MSMEG_5899* (mce4B), *MSMEG_5898* (mce4C), *MSMEG_5897* (mce4D), *MSMEG_5896* (mce4E), *MSMEG_5895* (mce4F), *MSMEG_5894* (mas4A), *MSMEG_5893* (mas4B) y el mutante del operón *mce4* completo se realizó mediante deleción por el sistema RecET de recombinación homóloga en *M. smegmatis* mc²155. En primer lugar, el gen de la higromicina (*hyg*) se amplificó mediante PCR utilizando como molde el plásmido pKM342. Los oligonucleótidos diseñados para realizar esta PCR contienen una región homóloga al gen *hyg* de 20 nucleótidos, la secuencia *loxP* y una secuencia homóloga a la región donde se quiere realizar la recombinación de unos 20 nucleótidos de longitud. El producto de la PCR se purificó del gel con el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) y posteriormente se usó como molde de una segunda PCR con la que se pretende alargar la secuencia homóloga a la región donde se quiere realizar la recombinación hasta una longitud total de 120-130 nucleótidos. Una vez obtenido y purificado este segundo producto de PCR, se

inoculó un cultivo de la cepa *M. smegmatis* mc²155 (pJV53), que expresa las proteínas del sistema RecET, en 50 mL de medio 7H9/ADC/Tween hasta alcanzar una DO₆₀₀ 0.7-0.8 (14 h de cultivo aproximadamente). En ese momento, se añadió al cultivo acetamida a una concentración final del 0.2% (v/v) (Sigma) para inducir la expresión de los genes del sistema RecET y se dejó incubando a 37 °C durante 3 h en agitación. Tras el periodo de inducción, el cultivo se enfrió a 4 °C durante 10 min y se comenzó la preparación de células competentes adaptando los volúmenes a 50 mL (ver apartado 3.2.1. de este mismo capítulo). Una vez preparadas las células competentes, se dividieron en diferentes alícuotas de 200 µL. Cada producto de PCR purificado (1 µg total) se utilizó para electroporar 3 alícuotas diferentes de competentes. Una vez electroporadas y tras la adición del medio de recuperación 7H9/AD/Tween, todas las electroporaciones del mismo producto se juntaron en un mismo tubo tipo Falcon y se incubaron durante 4 h a 37 °C y en agitación. Los transformantes se seleccionaron en placas de 7H10 con higromicina (Hyg) (50 µg mL⁻¹) (Hyg50). Las colonias obtenidas se replicaron en placas de 7H10 con Hyg (50 µg mL⁻¹) y se utilizaron a su vez para inocular en paralelo cultivos líquidos de 7H9 + Hyg50. Tras aproximadamente 18 horas de incubación, estos cultivos se utilizaron para realizar una PCR con oligonucleótidos internos y externos al gen *hyg* para verificar la correcta inserción del gen en la zona de interés (Tabla 4). Los transformantes que fueron positivos para las PCR de comprobación eran mutantes por inserción con el gen *hyg* reemplazando el fragmento de ADN que se quería mutar (Fig. 8).

4.7.2 Construcción de mutantes por delección mediante el sistema de recombinación Cre-loxP en *M. smegmatis*

Con el objetivo de evitar efectos polares de las mutaciones generadas por inserción en los genes del operón *mce4*, se usó el sistema de recombinación Cre-loxP para deleccionar el gen de resistencia. La colocación y orientación de los sitios *loxP* (que se introducen en la secuencia de ADN a recombinar) determinan la secuencia genómica a escindir, mientras que la disponibilidad en el tiempo y/o el espacio de la recombinasa Cre, dicta cuándo y dónde se produce la recombinación y por tanto, el “knock-out”. Los sitios *loxP* se disponen en parejas flanqueando el segmento de ADN a eliminar, cuando la recombinasa Cre se expresa, se une a los sitios *loxP*, los corta por la mitad y después une las dos mitades restantes tras haber eliminado el ADN situado entre ambos (Lakso *et al.*, 1992). Una vez verificado por PCR que las colonias resistentes a higromicina poseen la inserción en la región correcta del genoma, se replicaron cada una de ellas en placas de 7H10+Hyg50 y posteriormente en 7H10+Km25 hasta conseguir colonias resistentes a higromicina y sensibles a kanamicina (verificación de la pérdida del plásmido pJV53). Las células que habían perdido el plásmido se utilizaron para inocular un cultivo líquido en medio 7H9/AD/Tween con Hyg50 para la realización de células competentes (ver apartado 3.2.1. de este mismo capítulo). Estas células competentes se utilizaron para electroporar 1 µg total del plásmido Cre-Km que contiene la recombinasa Cre. Tras las 4 h de incubación las células se plaquean en 7H10+Km25 para su selección. Se considera que el

tiempo necesario para el crecimiento de la bacteria es suficiente para que la recombinada Cre presente escinda el fragmento de ADN localizado entre los sitios *loxP*. Las colonias obtenidas se replicaron secuencialmente en placas de 7H10 (conservación de la colonia), 7H10+Hyg50 (comprobación de presencia del gen de resistencia a higromicina) y 7H10+Km25 (comprobación de presencia del plásmido Cre-Km). Las réplicas que finalmente fueron Hyg sensibles y Km sensibles se seleccionaron y finalmente se realizó una PCR para comprobar la correcta delección de la zona de interés así como del gen de resistencia a higromicina. Los clones resultantes que fueron positivos en las diferentes PCR contenían la delección específica del gen o genes de interés sin ningún tipo de marcador de resistencia (Fig. 8).

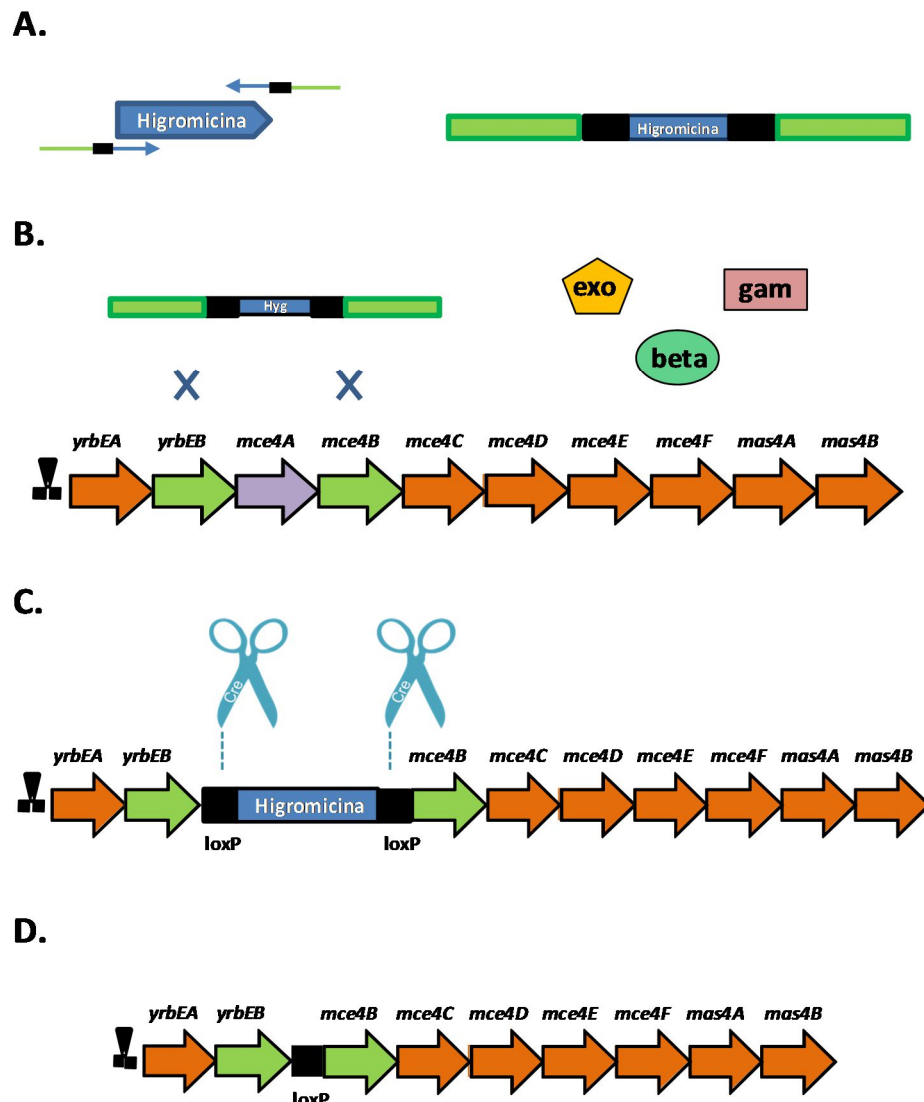


Figura 8. Sistema de recombinación recET utilizado para la generación de mutantes en *M. smegmatis* mc²155. **A.** Producto de PCR obtenido conteniendo el gen de resistencia a higromicina flanqueado por las regiones homólogas al gen a deleccionar. **B.** El producto de PCR se electropora en la cepa diana que deberá expresar las proteínas del sistema RecET, produciendo la recombinación homóloga del gen de resistencia en la región de interés. **C.** La expresión de la recombinasa Cre produce cortes en los sitios *loxP*. **D.** La cepa final porta la delección del gen de interés y no contiene ningún gen de resistencia.

4.8. Sistema de clonaje Gateway Multisite

El denominado sistema de clonaje Gateway (Invitrogen) se basa en el sistema integrasa */att* del bacteriófago lambda de *E. coli*. En esta tecnología, se emplean dos reacciones secuenciales denominadas recombinación BP y recombinación LR (Fig. 9). La reacción BP es catalizada por la enzima BP Clonasa (Invitrogen), que recombina específicamente los sitios *attB* con sitios *attP* generando tras la recombinación sitios *attL* y sitios *attR*. La Clonasa LR (Invitrogen) se encarga de la recombinación de los sitios *attL* con sitios *attR* generando tras la recombinación sitios *attB* y *attR*.

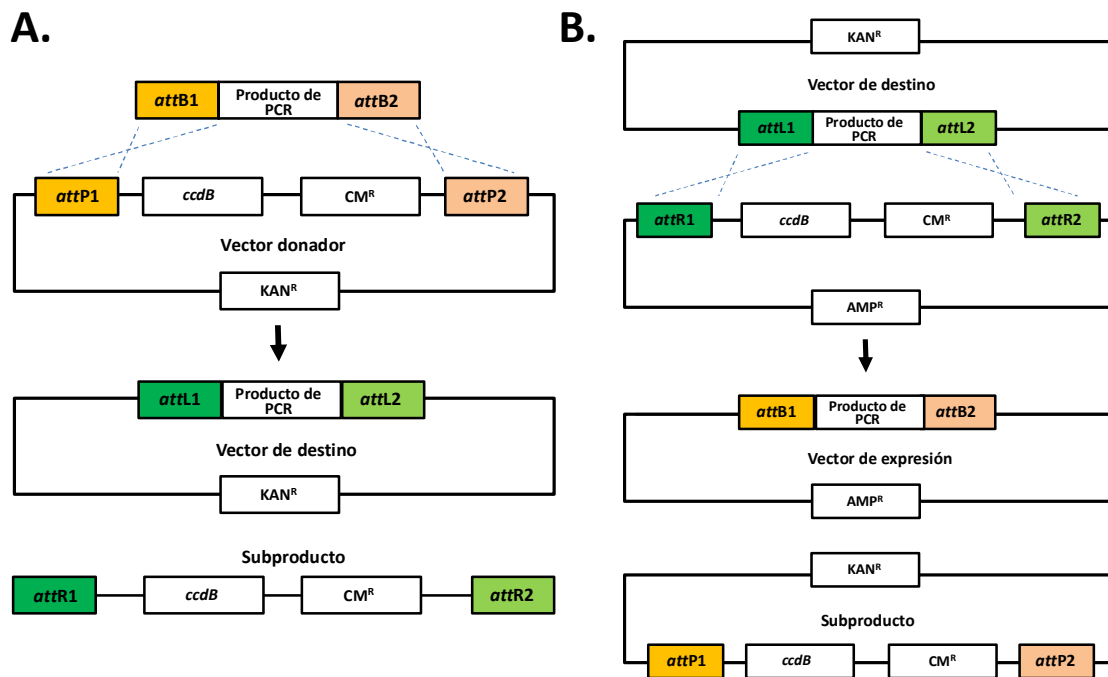


Figura 9. Sistema de clonaje Gateway. A. Reacción de recombinación BP de un producto de PCR flanqueado por sitios *attB* con un vector donador Gateway. B. Reacción de recombinación LR de un clon de entrada conteniendo un fragmento de ADN con un vector de destino Gateway.

De esta manera, cualquier fragmento de ADN de interés puede ser amplificado por PCR utilizando cebadores que contengan los sitios *attB* y clonados posteriormente en un vector donante que contenga los sitios *attP* en presencia de la Clonasa BP. La reacción de recombinación genera un plásmido donador en el que se produce el inserto de interés flanqueado por sitios *attL* y un subproducto, flanqueada por los sitios *attR* (Fig. 9 A). Una vez en el plásmido donador, este inserto se puede movilizar a cualquier vector de destino que posea los sitios *attR* a través de la reacción denominada LR (Fig. 9 B). De esta manera, la reacción LR genera un vector denominado de expresión en el que se produce el inserto de interés flanqueado por sitios *attB* y un subproducto, flanqueada por los sitios *attP* (Fig. 9 B). El sistema Gateway

está diseñado de tal manera que el resultado de cada proceso de recombinación se puede seleccionar fácilmente mediante una combinación de un evento positivo (la resistencia al antibiótico específico en los clones positivos) y un evento negativo (mediados por los genes citotóxicos como *ccdB*). Todos los subproductos generados contienen el gen *ccdB* que codifica una proteína tóxica para las células que lo expresan, por lo que las células que se transforman o bien con un plásmido en el que no haya tenido lugar la recombinación o bien con el subproducto generado no sobreviven.

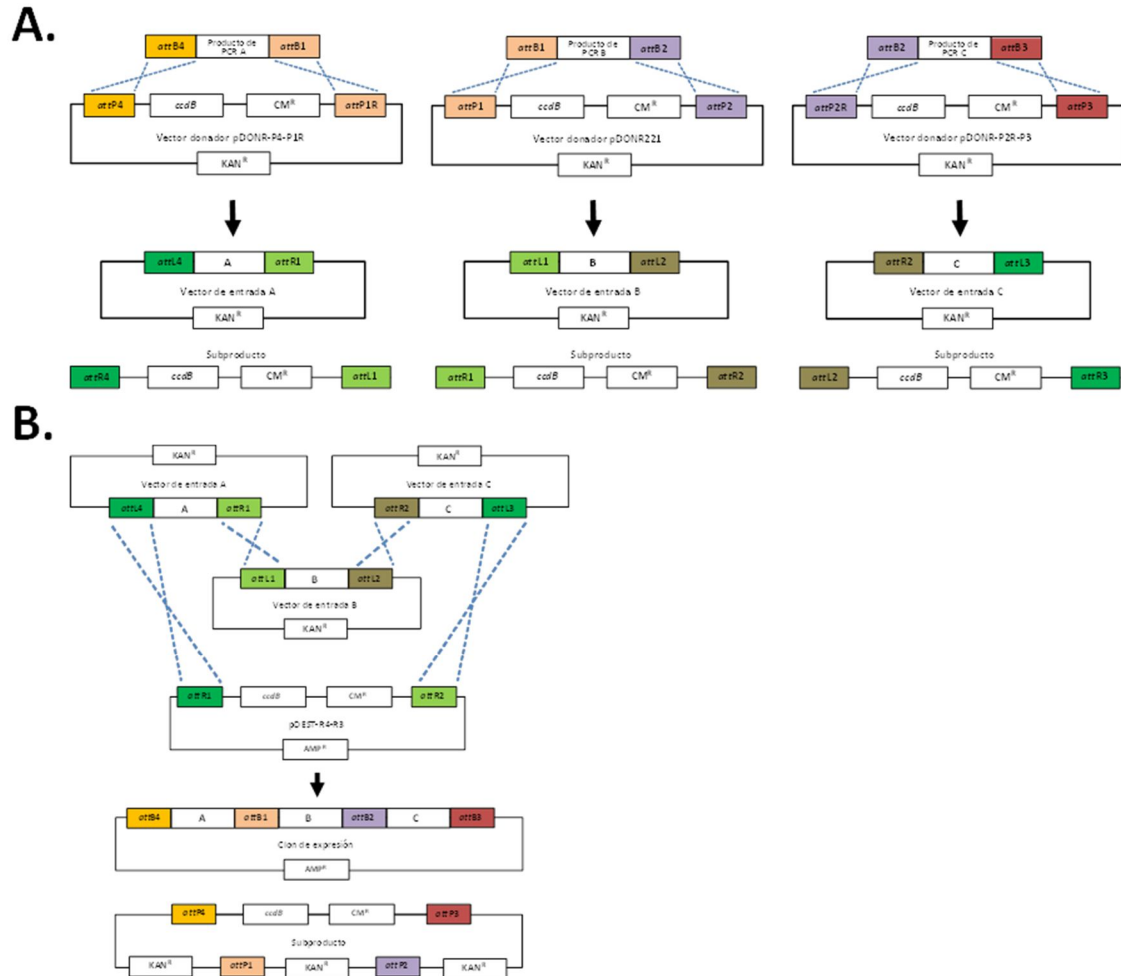


Figura 10. Sistema de recombinación Multisite Gateway. A. Reacciones de recombinación BP de tres productos de PCR “A”, “B” y “C” flanqueados por sitios *attB* con tres vectores donadores Gateway. B. Reacciones de recombinación LR plus de 3 clones de entrada conteniendo los fragmentos de ADN “A”, “B” y “C” con el vector de destino pDEST-R4-R3.

Una variante de la tecnología de clonación de recombinación Gateway se denomina Gateway MultiSite (Invitrogen) y ha sido desarrollada para facilitar el clonaje de múltiples fragmentos de ADN a la vez. Mediante el uso de cuatro sitios *attB* diferentes, tres PCR,

flanqueadas por los sitios específicos *attB* pueden ser clonados en tres vectores donantes que lleven los correspondiente sitios *attP* (Fig. 10 A). Posteriormente y con una sola reacción LR con los tres clones donantes de entrada y el vector de destino es posible crear una construcción final con los tres insertos en una determinada posición y orientación de interés (Fig. 10 B).

El sistema de expresión micobacteriana Gateway se ha desarrollado en el laboratorio de C. M. Sassetti (University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA) y consiste en una amplia biblioteca de vectores donadores y de destino diseñados para permitir la expresión de cualquier gen bajo el control de numerosos promotores y la posibilidad de añadir además diferentes marcajes en el extremo N- o C-terminal de la proteína de interés. El sistema Multisite Gateway se utilizó para la construcción de las versiones truncadas de la ATPasa MceG. El diseño de los cebadores necesarios para el sistema de clonación Gateway se realizó incluyendo los sitios *attB2* y *attB3* en los extremos *forward* y *reverse* respectivamente. Con dichos cebadores se realizaron amplificaciones mediante PCR de 3 versiones truncadas del gen *MSMEG_1366* utilizando el ADN genómico de *M. smegmatis* como molde. Cada uno de los productos de PCR obtenidos se purificaron utilizando el sistema High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) y se clonaron en el plásmido donador pD023 (Amp^R, Cm^R, *ccdB*) (cedido por el grupo de C.M. Sassetti, University of Massachusetts Medical School, USA), que contiene los sitios *attB2* y *attB3* flanqueando los genes *ccdB* y el gen de resistencia a Cm siguiendo las especificaciones del proveedor (Invitrogen), dando lugar a los diferentes vectores donadores pDATPasa (Fig. 11). La reacción de recombinación BP sustituye los genes *ccdB* y el gen de resistencia a Cm por el producto de PCR con las diferentes versiones truncadas del gen *MSMEG_1366*, por lo que las colonias positivas obtenidas tras la transformación se seleccionan por ser resistentes a Ap. Tras verificar la correcta inserción de las versiones truncadas de la ATPasa en el plásmido pD023, se realiza la reacción LR con los diferentes vectores donadores pDATPasa (Ap^R) generados; un segundo plásmido donador pEN41A-P46 (Ap^R) con el promotor micobacteriano P46 flanqueado por los sitios *attB4* y *attB1*; un tercer plásmido donador pEN12A-Venus (Ap^R) con la proteína fluorescente Venus y el epítipo FLAG flanqueados por los sitios *attB1* y *attB2* y un cuarto plásmido de expresión receptor pDE43-MEK (Km^R, *ccdB*) con los sitios *attB4* y *attB3* (Fig. 11).

Para realizar la reacción LR uno de los pasos críticos consiste en utilizar exactamente la cantidad exacta de cada plásmido en la reacción. En esta reacción se utilizaron 10 fmoles de cada uno de los plásmidos donadores, 20 fmoles del plásmido de expresión y 1 µl de la enzima LR Clonasa II Plus (Invitrogen). La reacción se incubó durante toda la noche a 25°C, posteriormente es utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5α (NEB). Los transformantes obtenidos se seleccionan en LB y Km (50 µg mL⁻¹) y se secuencian para verificar la correcta inserción del gen de cada uno de los fragmentos en el orden y orientación deseados.

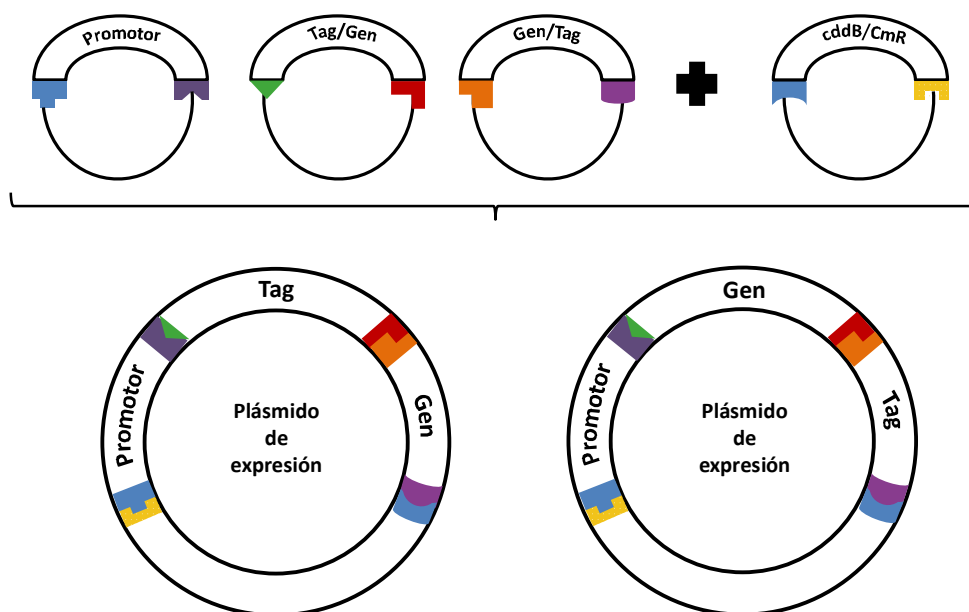


Figura 11. Sistema de recombinación Gateway Multisite utilizado para la generación de las diferentes versiones truncadas de la ATPasa.

4.9. Creación de mutaciones puntuales en dominios específicos de las permeasas YrbE4

Para la generación de cada uno de los mutantes puntuales en las permeasas YrbE4 se diseñaron 2 cebadores, tanto el directo como el reverso se unen a la misma secuencia diana pero contienen las bases mutadas en el centro del oligo. El molde utilizado para la amplificación por PCR se obtuvo a partir de la construcción realizada para la complementación del mutante $\Delta yrbE4$ (pMVyrbE4) que se digirió con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* para liberar el fragmento correspondiente a los genes *yrbE4*. El producto liberado se purificó y se ligó en el plásmido pUC19 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción para poder trabajar en *E. coli* generando la construcción pUCyrbE4. Con los cebadores Mut5902_F y Mut5901_F, complementarios a las dos hebras de la construcción pUCyrbE4 pero con la secuencia de interés mutada en el centro del cebador, se realizó una PCR con la construcción pUCyrbE4 como molde. Los extremos 5' de cada oligonucleótido utilizado no se encuentran exactamente enfrentados en secuencia por lo que en el producto final de PCR se generan extremos solapantes. Debido al gran tamaño de la construcción usada en la PCR (aproximadamente 4 kb), las dos hebras generadas permanecen hibridadas pero con dos cortes, uno en cada hebra, localizados separados el uno del otro (Fig. 12). Los productos obtenidos se purificaron y se digirieron con 1 μ L de la enzima *DpnI* durante 1 h para eliminar los restos de ADN circular usados como molde en la PCR.

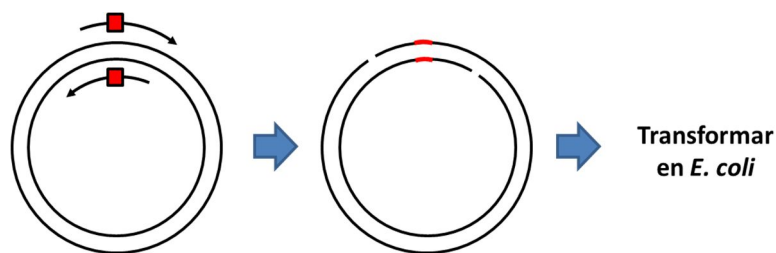


Figura 12. Esquema del protocolo utilizado para la realización de la mutagénesis dirigida en las permeasas YrbE4.

El producto se purificó de nuevo y se transformó en células de *E. coli* DH5 α , donde los extremos solapantes de ligan dando lugar a plásmidos circulares completos. Las colonias obtenidas de esta transformación se verificaron mediante PCR y se secuenciaron. Una vez confirmada la presencia de la mutación puntual en la región de interés, el plásmido pUCyrbE4 generado se digirió de nuevo con las enzimas *Eco*RI y *Hind*III para liberar el inserto que contenía la secuencia YrbE4 mutada. El fragmento purificado se subclonó posteriormente en el plásmido pMV261 que replica en *Mycobacterias* digerido con las mismas enzimas de restricción. La construcción resultante (pMVyrbE4) con las diferentes mutaciones puntuales se electroporó en la cepa *M. smegmatis* Δ yrbE4 para realizar los estudios posteriores.

5. Técnicas de manipulación de ARN

5.1. Extracción de ARN de *M. smegmatis*

El ARN para el análisis de la expresión génica en *M. smegmatis* mc²155 se extrajo a partir de cultivos en medio mínimo con glicerol 18 mM o colesterol 1.8 mM como única fuente de carbono y energía. Se recogieron 15 mL de cultivo en fase exponencial ($DO_{600} = 0.6-0.8$) o estacionaria ($DO_{600} = 3.2$ para el glicerol y $DO_{600} = 1.8$ para colesterol) y se añadieron a 35 mL de solución de tiocianato de guanidinio (tiocianato de guanidinio 5 M (Sigma), sarkosyl 0.5% (Sigma), citrato sódico 25 mM (Sigma)) para interrumpir la transcripción. El cultivo se centrifugó 10 min a 4000 x g a 4 °C y tras descartar el sobrenadante, las células se conservaron a -80 °C hasta su uso. Las células recogidas se resuspendieron en 700 μ L de solución Kirby (fórmula por 100 mL de solución: 15 mL de SDS 10%, 48 mL de EDTA 0.5 M y 87 mL de agua) y 300 μ L de lisozima (50 mg mL⁻¹) (Sigma). Este volumen se transfirió a tubos Falcon de 15 mL a los que se había añadido previamente bolas de vidrio de entre 150-212 μ m de diámetro (Sigma), la mezcla se agitó y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. A esta suspensión se añadieron 200 μ L de FCIA (fenol-cloroformo-isoamílico) y se realizan dos pasos de agitación durante 1.5 min seguido de 2 min de incubación a 4 °C. Posteriormente se

añadieron 800 μ L de solución RLT (Qiagen) a cada muestra y se incuban durante 10 min a 4°C. Tras este periodo de incubación se añaden 1.4 mL adicionales de FCIA y se realizan de nuevo dos pasos secuenciales de agitación durante 1.5 min seguido de 2 min de incubación a 4 °C. Los extractos solubles se recuperaron mediante centrifugación durante 5 min a 13000 x g a 4 °C y se añadieron directamente a nuevos tubos Falcon a los que se les había añadido previamente 700 μ L de etanol absoluto (Merck).

Este procedimiento se realizó por duplicado para cada cultivo, usando un total de 30 mL de cada uno. En este punto, los extractos solubles de los duplicados se recogieron en un mismo tubo y el ARN se purificó utilizando el RNeasy kit (Qiagen) según las especificaciones del fabricante. Durante el proceso de purificación el ADN fue eliminado mediante digestión en columna con DNaseI (Quiagen). Las muestras se eluyeron en 30 μ L de agua. Para eliminar el ADN residual se realizó un segundo tratamiento con DNase en solución empleando el *DNase and Removal treatment kit* (Ambion), siguiendo las especificaciones del fabricante. La integridad y distribución de tamaños del ARN total purificado se comprobó en un gel de agarosa al 1% y la cantidad de ARN extraído se midió utilizando un NanoPhotometer®Pearl (Implen, GmbH). Las muestras de ARN se conservaron a -80 °C.

5.2. Extracción de ARN de *C. glutamicum*

El ARN para el análisis de la expresión del operón *mce4* clonado heterológamente en *C. glutamicum* R31 se extrajo a partir de cultivos en medio TSB. Se recogieron 100 mL de cultivo en una fase exponencial de crecimiento ($DO_{600} = 2.5$), se mezclaron con 100 mL de NaCl 0.9% (p/v) estéril a punto de congelación y se centrifugaron a 8000 rpm y 4°C durante 3 min. Tras eliminar el sobrenadante, las células se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservan a -80°C hasta su utilización. Una vez congeladas, las células se lisan en un mortero de porcelana (lavado con etanol y cloroformo y conservado siempre frío con nitrógeno líquido junto con 0.2 g (aproximadamente) de alúmina estéril (Sigma), tras lo cual se pasa a tubos Eppendorf de 2 mL hasta ocupar $\frac{1}{4}$ del volumen del tubo. Se añaden 350 μ L de tampón de lisis RLT (Kit ARN total RNeasy, Quiagen) a la muestra y se agita vigorosamente hasta su completa homogeneización (el tampón RLT debe ser suplementado con un 1% (v/v) de β -mercaptoetanol (Sigma) justo antes de su uso). Se centrifuga 3 min a 14000 rpm para eliminar los restos celulares y la alúmina y se recoge el sobrenadante en otro tubo. Se añaden 250 μ L de etanol absoluto al lisado y se mezcla bien pipeteando. Se aplica la muestra sobre la columna comercial (Kit ARN total RNeasy, Quiagen) y se centrifuga 15 s a 10000 rpm. A continuación se realizan lavados sucesivos con 700 μ L de tampón RW1 y dos lavados con 500 μ L de tampón RPE. En los dos primeros lavados la centrifugación se realiza durante 15 s a 10000 rpm, mientras que el último se realiza durante 2 min a 14000 rpm para eliminar todos los restos de etanol que pudieran interferir en reacciones posteriores. Por último, se aplican 30 μ L de H_2O -DEPC y se centrifuga a 8000 rpm durante 1 min para eluir el ARN.

Para eliminar el ADN residual se realizó un segundo tratamiento con DNAsa en solución empleando el *DNase and Removal treatment kit* (Ambion), siguiendo las especificaciones del fabricante. La integridad y distribución de tamaños del ARN total purificado se comprobó en un gel de agarosa al 1% y la cantidad de ARN extraído se determinó midiendo su densidad óptica a 260 nm utilizando un NanoPhotometer®Pearl (Implen, GmbH). Las muestras de ARN se conservaron a -80 °C. Todas las centrifugaciones se realizaron en una microcentrífuga MiniSpin de Eppendorf.

5.3. Retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR)

Una vez purificado el ARN se obtuvo el ADN complementario (ADNc) mediante una reacción de retrotranscripción mediada por la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen). Cada reacción de retrotranscripción (20 µL) contenía 1 µg de ARN, 200 U de transcriptasa reversa (Sigma), ditiotreitól (DTT) 10 mM (Sigma), dNTPs 0.5 mM y 5 mM de pd(N)₆ *random hexamer 5' phosphate* (Amersham Biosciences). Los hexámeros se emplearon como cebadores para poder emplear las mismas alícuotas de ADNc como molde para reacciones de PCR en los que se emplean diversos pares de oligonucleótidos. En primer lugar el ARN y los hexámeros se incubaron a 65 °C durante 5 min para permitir la hibridación de los mismos y tras enfriar a 4°C se añadieron los restantes componentes de la reacción, que se incubó a 42 °C durante 2 h. La reacción se inactiva con una incubación de 15 min a 70 °C. De forma paralela se realizaron controles sin retrotranscriptasa (RT-) para cada una de las muestras. El ADNc obtenido se empleó como molde para la PCR posterior, en la que los oligonucleótidos requeridos en cada caso se utilizaron a una concentración final de 0.5 µM y se añadió 1 U de la ADN polimerasa I (Biotools).

5.4. PCR en tiempo real (qRT-PCR)

Para analizar los niveles de transcripción de diferentes genes se realizaron experimentos de PCR en tiempo real en un *iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad). Se amplificaron fragmentos internos de alrededor de 100 pb de cada uno de los genes de interés. Las reacciones se realizaron por triplicado empleando diluciones $\frac{1}{5}$ y $\frac{1}{50}$ de ADNc, una concentración final de 0.2 mM de cada cebador y 12.5 µL de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en 25 µL de reacción. Las parejas de cebadores utilizadas se muestran en la Tabla 4. Cada ciclo de PCR consistió en un primer paso de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, un segundo paso a la temperatura de fusión específica para cada pareja de oligonucleótidos durante 30 s y por último una etapa de elongación a 72 °C durante 30 s. Se realizaron 40 ciclos. La cantidad relativa de ARNm para cada gen se determinó siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak *et al.*, 2001) usando los niveles del ARNm del gen *sigA* (*MSMEG_2758*) como control interno. Los datos que se muestran son la media de tres experimentos independientes. La obtención y el

análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el iQ5 Optical System Software (Versión 2.0) (Bio-Rad).

6. Técnicas de manipulación de proteínas

6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en condiciones desnaturalizantes en presencia de (SDS, en geles de poliacrilamida (PAGE), a una concentración del 12.5% según la técnica descrita previamente (Laemmli, 1970). Las muestras se hirvieron durante 10 min en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 250 mM pH 6.8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.05%). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente, empleando un electrolito de composición: Tris-HCl 25 mM (pH 8.0), glicina 192 mM y SDS 0.1%. Las proteínas fueron teñidas con Coomassie Brilliant Blue R250, según se describe previamente (Swank *et al.*, 1971).

Las proteínas empleadas como marcadores de tamaño molecular (miosina, 200 kDa; β -galactosidasa, 116.2 kDa; fosforilasa B, 97.4 kDa; BSA, 66.2 kDa; ovoalbúmina, 45.0 kDa; anhidrasa carbónica, 31.0 kDa; inhibidor de tripsina, 21.5 kDa; lisozima, 14.4 kDa; aprotinina, 6.5 kDa) fueron proporcionadas por Bio-Rad (marcadores Broad-Range).

6.2. Obtención de extractos proteicos de *M. smegmatis* y *R. erythropolis*

Para obtener extractos de *M. smegmatis* y de *R. erythropolis* se centrifugó un volumen de los cultivos correspondientes, las células se lavaron 2 veces en solución salina (NaCl 0.9% en H₂O destilada) y se resuspendieron en 1 mL de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7.0). Las muestras se sonicaron en un sonicador Branson 150 enfriadas a 4 °C aplicando 5 pulsos de 25 s a intensidad 9 del equipo incubando los tubos 1 min a 4 °C entre pulso y pulso. Después se centrifugaron durante 15 min a 14000 x g a 4 °C para separar la fracción celular soluble de la insoluble. La concentración de proteína total se determinó mediante el uso del método de Bradford (Bradford, 1976) con albúmina de suero bovino (BSA) como patrón.

6.3. Ensayos enzimáticos *in vitro* de actividad deshidrogenasa

Los extractos proteicos de *E. coli* BL21 (DE3) y de *R. erythropolis* IGTS8 que contenían la construcción pET5228 y pTip5228 respectivamente se ensayaron a 37 °C en un volumen final de reacción de 600 μ L. Los diferentes sustratos se disolvieron en etanol (colesteno, DHEA y pregnenolona) o isopropanol (colesterol) a una concentración final de 0.15 mM y se añadió NAD⁺ como cofactor de la reacción a una concentración final de 1.35 mM. La medida de la actividad enzimática se realizó mediante la monitorización de la densidad

óptica a 340 nm del NADH en diferentes condiciones de ensayo. Todas las reacciones se iniciaron mediante la adición del extracto proteico.

6.4. Técnica de *Western blot*

El análisis de la producción de las proteínas ATPasa360, ATPasa322, ATPasa292 y ATPasa258 en la cepa mutante *Δ1366* se realizó mediante *Western blot*. En primer lugar, los extractos proteicos de cada una de las cepas (40 µg) se sometieron a electroforesis (PAGE-SDS al 12.5%). A continuación, las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Sambrook *et al.*, 2001). La membrana se saturó con leche en polvo desnatada al 2% (p/v) en tampón PBS (fosfato sódico 10 mM, pH 7.4, conteniendo NaCl 140 mM) mediante incubación a 4 °C durante 16 h. Tras 3 lavados de 15 min con PBS que contenía Tween20 al 0.1% (v/v), la membrana se incubó durante 1 h a 4 °C con agitación suave en presencia de una dilución 1/1000 del anticuerpo anti-FLAG (SIGMA). Posteriormente, se repitieron los tres lavados con PBS con Tween20 al 0.1% (v/v) y la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y agitación suave en presencia de una dilución 1/5000 de anticuerpos ECLTM *Anti-rabbit* IgG (GE Healthcare). Finalmente, tras tres lavados con PBS-Tween, las bandas se revelaron con el sistema ECLTM *Western Blotting Detection* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante y se expusieron en películas Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech).

7. Técnicas cromatográficas

7.1. Extracción de esteroides

La extracción de esteroides a analizar por las diferentes técnicas cromatográficas se llevó a cabo recogiendo alícuotas (860 µL) de los diferentes cultivos a los que se le añadieron los correspondientes patrones internos antes de comenzar el proceso de extracción.

Las muestras con el patrón interno se extraen en 10 ml de cloroformo y se homogenizan empleando un homogeneizador Bullet Blender 50-DX-CE a velocidad 12, durante 3 min. Tras la ruptura, las células se centrifugan 10 min a 4000 rpm en una microcentrífuga MiniSpin de Eppendorf a 4 °C y posteriormente los tubos se congelan a -80°C durante 10-15 min para separar correctamente las dos fases. La fase orgánica se recoge, se pasa a tubos Falcon de 50 mL nuevos y se evapora a totalidad a 70 °C.

7.2. Cromatografía en capa fina (TLC)

Las placas de TLC utilizadas (Silica gel 60 F₂₅₄ 20 x 20 cm, Merck) se recortan dejando 1 cm de margen en cada lado, 8 cm de carrera y 1 cm de separación entre muestra y muestra. Las diferentes muestras extraídas se resuspenden en cloroformo (análisis de biotransformaciones) o diclorometano (análisis de ácidos micólicos) en un volumen de entre 20-100 µl dependiendo de la concentración esperada en cada caso. Para realizar la TLC, 10 µl de cada muestra se cargan sobre la placa de TLC y una mezcla de hexano:acetato de etilo (10:4) (Merck) en el caso de las biotransformaciones de esteroides o petróleo éter:dietil éter (9:1) (Sigma) en el caso del análisis de la composición de los ácidos micólicos se usa como fase móvil. Los diferentes esteroides de las biotransformaciones se revelan con una solución del 20% de H₂SO₄ (v/v) mientras que los ácidos micólicos son revelados con una solución al 5% de ácido molibdénico (Sigma) en etanol (v/v).

7.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS)

La detección y cuantificación de los productos generados en las reacciones de deshidrogenación llevadas a cabo con la β-hidroxideshidrogenasa de *M. smegmatis* (MSMEG_5228) se realizó mediante HPLC-DAD-MS usando un equipo de cromatografía líquida (Surveyor Plus LC) equipada con inyector automático acoplado en serie a un detector DAD que permitió monitorizar la elución a DO₂₄₀ y con una trampa iónica (LXQ) equipada con una fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI) y una fuente de isoelectronebulización (IES), todo ello suministrado por Thermo Electron (San Jose, CA, EE.UU.). Los datos se procesaron con el software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EE.UU.).

La separación se realiza mediante una columna de fase reversa C18 y a un gradiente determinado en cada caso (véanse apartados 9.9.1, 9.1.2).

7.3.1. Detección y cuantificación de colesterol y colesteno en los ensayos *in vitro*

La separación cromatográfica se realizó en una columna Tracer Excel 120 ODSB C18 (150 mm × 4.6 mm de diámetro interno, 5 µm de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona, Spain). La fase móvil empleada contenía acetonitrilo/agua (90:10, v/v) y acetonitrilo/isopropanol (85:15, v/v) como fases A y B respectivamente. El flujo empleado fue de 1 ml min⁻¹ y el gradiente lineal utilizado fue el siguiente: 100% de A durante 5 min, incrementado a 100% de B en 35 min. Tras mantener 100% de B durante 7 min se restablecieron las condiciones iniciales, reequilibrándose la columna durante 8 min. Durante este gradiente, el eluyente pasó al espectrómetro de masas desde el minuto 2 hasta el 45.

La optimización de los parámetros en el espectrómetro de masas se realizó a partir de soluciones madre de patrones de colesterol (Sigma) y colesteno (Fluka) en acetonitrilo (Scharlab) a una concentración inicial de 5 mM, inyectados en la trampa iónica mediante infusión directa con una velocidad de flujo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. Así, el valor de los distintos parámetros que permiten una mayor sensibilidad de detección son los siguientes: temperatura del capilar 275 °C, temperatura de vaporización 425 °C, voltaje del capilar 39 V, voltaje de descarga de la corona 6.00 kV, corriente de la fuente 6.00 μA y 15 eV para la energía de disociación por colisión. Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de la solución madre de colesterol y colesteno en acetonitrilo, en concentraciones comprendidas entre 50 μM y 250 μM para el colesterol, y 10 μM y 150 μM para la colesteno, a las que se añadió 500 μM de 27OH-colesterol como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar (véase apartado 7.1 de materiales y métodos). Una vez realizada la extracción, los residuos se resuspendieron en 10 mL de acetonitrilo (Scharlab) de los que se inyectaron 25 μL para su análisis cromatográfico.

7.3.2. Detección y cuantificación de GP175-OL y GP175-ONA.

La separación cromatográfica se realizó en una columna Mediterranea Sea C18 (150 mm \times 4.6 mm de diámetro interno, 5 μm de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona, Spain). La fase móvil empleada contenía agua + 0.1% ácido fórmico (Sigma), acetonitrilo + 0.1% ácido fórmico e isopropanol + 0.1% ácido fórmico como fases A, B y C respectivamente. El flujo empleado fue de 1 ml min^{-1} y el gradiente lineal utilizado fue el siguiente: 45 % de A y 55 % de B durante 5 min, incrementado a 95 % de B y disminuyendo a 5% de A en 10 min, manteniendo a 95% de B, disminuyendo A hasta 0% e incrementando C a 5% en 5 min, manteniendo A a 0%, disminuyendo B a 70% e incrementando C a 30% en 15 min, incrementando A a 45%, disminuyendo B a 55% y disminuyendo C a 0%. Tras mantener A a 45% y B a 55% durante 5 min se restablecieron las condiciones iniciales, reequilibrándose la columna durante 5 min. Durante este gradiente, el eluyente es analizado por el espectrómetro de masas desde el minuto 1 hasta el 45.

La optimización de los parámetros en el espectrómetro de masas se realizó a partir de soluciones de patrones de GP175-OL (Gadea Biopharma S.L.) en acetonitrilo (Scharlab) a una concentración inicial de 5 mM, inyectados en la trampa iónica mediante infusión directa con una velocidad de flujo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. Así, el valor de los distintos parámetros que permiten una mayor sensibilidad de detección son los siguientes: temperatura del capilar (350 °C), cobertura de nebulización (60 °C), voltaje del capilar (41 V), amplificador (400 Vp), corriente de la fuente (6.00 μA) y energía de disociación por colisión (15 eV). Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de la solución madre de GP175-OL en acetonitrilo, en concentraciones comprendidas entre 625 μM y 2 mM para el colesterol, a las que se añadió 700 μM de colesteno como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar (véase apartado 7.1 de materiales y métodos). Una vez realizada la extracción, los residuos se resuspendieron en 10 mL de acetonitrilo (Scharlau) de los que se inyectaron 25 μL para su análisis cromatográfico.

La cuantificación de GP175-ONA, se realiza mediante el cálculo de rendimiento de la reacción empleando las áreas corregidas, al no disponer de producto puro. Se calcula el rendimiento de la biotransformación como:

$$\Psi_{P/S} = \frac{A\left(\frac{GP175-ONA}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{GP175-ONA}{ISTD}\right) + A\left(\frac{GP175-OL}{ISTD}\right)\right]}$$

Teniendo en cuenta que el rendimiento molar de la reacción es 1:1, asumiendo la no existencia de subproductos, es posible calcular la concentración del producto GP175-ONA

7.4. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

Una vez extraída y evaporada la muestra (ver apartado 7.1 de materiales y métodos), los derivados trimetilsililéter (TMT) se forman añadiendo a cada muestra 50 μL de N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) (Sigma) y 50 μL de piridina (Sigma) durante 45 min a 60 °C. Los patrones utilizados para realizar las correspondientes rectas de calibrado se derivatizaron siguiendo el mismo procedimiento. El análisis por GC/MS se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de gases Agilent 7890A acoplado a un detector de masas Agilent 5975C (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA). Los espectros de masas se detectan con fuente de ionización por impacto de electrones (IE) a 70 eV en un rango de m/z de 50-550.

7.4.1 Detección y cuantificación de dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona (AD)

Las condiciones utilizadas en la detección por GC/MS de dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona (AD) fueron las siguientes: relación de *split* 20:1; flujo constante de 1 mL min⁻¹; temperatura del inyector de 240 °C; programa de temperatura: isoterma a 240 °C durante 3 min, rampa de 2.5 °C min⁻¹ hasta alcanzar 270 °C y rampa de 10 °C min⁻¹ durante 3 min hasta alcanzar los 300 °C. El tiempo total del barrido cromatográfico es de 21 min.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de la solución de DHEA y AD en acetonitrilo, en concentraciones comprendidas entre 100 μM y 2 mM, a las que se añadió 700 μM de pregnenolona como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar (véase apartado 7.1 de materiales y métodos).

Para la cuantificación de las áreas de cada pico detectado, las masas consideradas fueron las del ión característico correspondiente para cada compuesto: 384 m/z para la colesteno, 286 m/z para el AD y 284 m/z para el DHEA en modo de monitoreo de ion seleccionado (SIM). El espectro de masas obtenido y los datos de tiempo de retención se usaron para identificar los diferentes compuestos gracias a la comparación de los mismos con patrones comerciales.

7.4.2 Detección y cuantificación de pregnenolona y progesterona

Las condiciones usadas en la detección por GC/MS de pregnenolona y progesterona fueron las siguientes: relación de *split* 20:1; flujo constante de 1 mL min⁻¹; temperatura del inyector de 240 °C; programa de temperatura: isoterma a 240 °C durante 3 min y rampa de 5 °C min⁻¹ durante 2 min hasta alcanzar 300 °C. El tiempo total del barrido cromatográfico es de 17 min.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de la solución de pregnenolona y progesterona en acetonitrilo, en concentraciones comprendidas entre 100 μM y 2 mM, a las que se añadió 700 μM de colesteno como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar (véase apartado 7.1 de materiales y métodos).

Para la cuantificación de las áreas de cada pico detectado, las masas consideradas fueron las del ión característico correspondiente para cada compuesto: 384 m/z para la colesteno, 388 m/z para la pregnenolona y 314 m/z para la progesterona en modo de monitoreo de ion seleccionado (SIM). El espectro de masas obtenido y los datos de tiempo de retención se utilizaron para identificar los diferentes compuestos gracias a la comparación de los mismos con patrones comerciales.

8. Estudios fenotípicos

8.1 Estudios de agregación

Para realizar los estudios de agregación las diferentes cepas de *M. smegmatis* se cultivaron en medio mínimo con glicerol 18 mM sin la adición de ningún detergente. Los

cultivos se mantuvieron en un agitador orbital a 37 °C durante tres días hasta alcanzar la fase estacionaria.

8.2 Estudios de morfología de colonia con Rojo Congo

Las placas para la realización de los estudios morfológicos se realizaron añadiendo el colorante Rojo Congo (Sigma) previamente autoclavado a una concentración final de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en agua durante la realización de placas de 7H10. Las diferentes cepas de estudio se cultivaron en medio 7H9 con Tween 80 hasta una fase de crecimiento estacionaria. En ese momento se realizaron diluciones seriadas en solución salina con Tween80 y posteriormente se sembraron las diluciones 10^{-8} y 10^{-9} en las placas con Rojo Congo. Las placas se mantuvieron durante tres días en la estufa de 37 °C hasta conseguir colonias aisladas. La morfología se observó en la lupa.

9. Ensayos de transporte con colesterol radiactivo

Para la realización de los ensayos de transporte de colesterol con radiactividad las células se cultivaron en medio mínimo con glicerol 18 mM con Tween80 al 0.05% (v/v) hasta una fase exponencial de crecimiento (DO_{600} 0.8-1.0). En ese momento, las células se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con solución salina (85 %) con Tween80 al 0.05% para eliminar la fuente de carbono. Finalmente las células se resuspendieron en 2 mL de medio mínimo a una DO_{600} de 20.0 utilizada en el ensayo. Cuando fue necesario y como control de nivel de adsorción de colesterol a la superficie celular, las células se incubaron en este momento con N,N'-diciclohexilcarbodiimida 2 mM (DCCD, Sigma) en DMSO (Sigma) durante 10 min a 37 °C. Posteriormente se añadieron 1 μL de colesterol marcado radiactivamente ($10 \mu\text{Ci mL}^{-1}$) y 20 μL de colesterol frío (1 mM) preparado en tyloxapol (2%) para iniciar el ensayo y las células se incubaron en un termobloque a 37 °C durante diferentes tiempos. Para parar el ensayo de transporte se añadieron 5 mL de PBS enfriado a 4 °C a las células y posteriormente se filtraron con filtros de un tamaño de poro de 0.45 μm mediante un sistema de filtración múltiple Millipore. Las células filtradas se lavaron secuencialmente con 30 ml de PBS con Tritón X-100 al 0.2% (v/v) y 10 mL de etanol al 50%. Los filtros se dejaron secar y posteriormente se pasaron a tubos eppendorf de 2 mL con líquido de centelleo para medir la radiactividad.

10. Extracción de ácidos micólicos (MAMEs)

Para la extracción de los ácidos micólicos las cepas de *M. smegmatis*, *M. smegmatis* $\Delta 1366$ y *M. smegmatis* Δmce4op se cultivaron en medio mínimo con glicerol 18 mM y Tween 80 al 0.05% (v/v). En caso de inducción de la respuesta estricta, se añadió DL-norvalina

(Sigma) a una concentración final de 0.5 mg mL^{-1} cuando las células alcanzaron una DO_{600} de 0.6. Se recogieron alícuotas de 50 mL de cada uno de los cultivos en diferentes condiciones de fase de crecimiento, se lavaron con 50 mL de PBS conservándose las células a -80°C . Una vez congeladas se liofilizaron durante 12 h y posteriormente, 25 mg del peso seco de cada muestra se pasaron a tubos de pyrex con tapas de PTFE (15 mm para viales de 7 mL, Supelco), se añadieron 2 mL de TBAH (Sigma) al 15% (v/v) y se dejaron incubando a 100°C durante 14 h. Tras la incubación las muestras se dejaron enfriar, se añadieron 2 mL de agua, 1 mL de diclorometano (Sigma) y 250 μL de yodometano (Sigma) y se dejaron agitando a temperatura ambiente durante 30 min. La parte acuosa se descartó y se realizaron lavados consecutivos de la fase orgánica con 2 mL de agua, posteriormente con 2 mL de HCl 0.1 N y finalmente otros 2 mL de agua. Tras realizar los lavados, la parte orgánica se recuperó, se transfirió a un tubo eppendorf de 2 mL y se dejó evaporar en un termobloque a 40°C . El sedimento obtenido se resuspendió con una mezcla de 0.2 mL de acetonitrilo y 0.1 mL de tolueno a los que posteriormente se añadieron 0.2 mL de acetonitrilo adicionales para precipitar los ácidos micólicos. La mezcla se mantuvo durante 1 h a 4°C y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm en una microcentrífuga MiniSpin de Eppendorf durante 10 min para recuperar los ácidos micólicos precipitados. La fase orgánica se descartó y el sedimento resultante se conservó a -20°C hasta su posterior análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC).

11. Técnicas de fluorescencia

Las diferentes versiones de la ATPasa fusionadas a la proteína fluorescente Venus se cultivaron en medio 7H9 con Tween80 al 0.05% hasta alcanzar la fase exponencial temprana (DO_{600} de 0.1), momento en el cual las células se centrifugaron, se lavaron con solución salina y finalmente se concentraron en un volumen final de 1 mL de solución salina con Tween80 al 0.05%. Una alícuota de estas células se colocó sobre una gota de agarosa al 1% solidificada sobre un portaobjetos. Posteriormente, las células se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Delta Vision personalDV (Applied Precision). El espectro de excitación/emisión usado fue entre 515 y 528 nm, utilizándose los filtros de GFP para detectar la señal fluorescente debido a que los picos son solapantes.

12. Análisis bioinformáticos

Los análisis de secuencias de ADN y proteínas se realizaron utilizando el paquete de programas DNASTAR así como los programas y bases de datos detallados a continuación. El análisis y búsqueda de secuencias nucleotídicas y proteicas de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* fue realizado utilizando el servidor *Comprehensive Microbial Resource* (CMR) (Craig Venter's Institute) (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>) y los servidores *Smegmalist*

(<http://mycobrowser.epfl.ch/smegmalist.html>) y *Tuberculist* (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). Para la búsqueda de secuencias nucleotídicas y proteicas de *R. erythropolis* se utilizaron las herramientas disponibles en el sitio *Rhodococcus Genome Project* (<http://www.rhodococcus.ca/>).

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos fueron comparadas con las existentes en las bases de datos mediante el uso de los algoritmos BLASTN y BLASTP, respectivamente a través del servidor del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/genom_table.cgi), a través del servidor CMR o el sitio *Rhodococcus Genome Project*. Los alineamientos múltiples de proteínas se llevaron a cabo con el programa CLUSTALW2 (Thompson *et al.*, 1994) alojado en el servidor EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Los números de acceso de las proteínas identificadas en los diferentes análisis bioinformáticos se analizaron en búsqueda de posibles interacciones proteica utilizando la base de datos STRING, versión 9.1 (<http://string.embl.de>) (Szklarczyk *et al.*, 2011).

Las masas moleculares teóricas de las proteínas se calcularon con el programa Compute pI/Mw del servidor ExPASy (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html). Las predicciones de estructura secundaria y tridimensional se realizaron con el programa SWISS-MODEL, también alojado en el servidor ExPASy (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>), y la visualización de los distintos modelos y los análisis posteriores se realizaron con el programa PyMol (DeLano, 2002). La búsqueda de dominios conservados en secuencias proteicas se llevó a cabo utilizando la base de datos PROSITE alojada en el servidor ExPASy (<http://www.expasy.ch/prosite/>).

VI. RESULTADOS

1. Caracterización de la ATPasa que energiza el sistema de transporte activo de colesterol en *M. smegmatis* mc²155

De acuerdo con lo descrito por Joshi *et al.* (2006) todos los operones de transporte *mce* de las Actinobacterias utilizan un único gen denominado *mceG* para producir la ATPasa asociada a estos sistemas de transporte. De hecho y como ya se ha comentado en el capítulo de Introducción, Pandey y Sasseti (2008) identificaron el gen *mceG* de *M. tuberculosis* demostrando su implicación directa en el sistema de transporte activo de colesterol en esta bacteria. La identificación y caracterización de la ATPasa responsable de energizar el transporte activo de colesterol en *M. smegmatis* han sido abordadas en esta Tesis Doctoral con el objetivo de determinar las posibles diferencias existentes entre el papel que puede desempeñar esta enzima en una cepa de crecimiento rápido y de vida fundamentalmente libre en el medio ambiente y en la cepa patógena de vida intracelular y de crecimiento lento *M. tuberculosis*.

1.1. Identificación *in silico* de la ATPasa implicada en el transporte activo de colesterol en *M. smegmatis* mc²155

Partiendo de la información disponible acerca del gen *mceG* en el inicio de esta Tesis Doctoral y como una primera aproximación, se realizó un análisis *in silico* de los seis operones *mce* presentes en *M. smegmatis* comprobándose que ninguno de ellos posee en su cercanía una posible ATPasa que energice el sistema de transporte.

Gracias a la comparación de secuencias con la ATPasa de *M. tuberculosis* y a través de un análisis detallado del genoma de *M. smegmatis*, se ha podido identificar el gen *MSMEG_1366* como el candidato más probable para codificar la ATPasa-Mce en esta bacteria (79% de identidad con el gen *mceG* de *M. tuberculosis*). Otros genes candidatos como el gen *MSMEG_5807* y el gen *MSMEG_3056*, anotados como presuntas ATPasas de transportadores ABC, mostraron sin embargo identidades inferiores, 26% y 23% respectivamente. Curiosamente, estos genes alternativos sí se encuentran localizados en operones de transportadores ABC al contrario de lo que ocurre con el gen *mceG*, que se localiza en el genoma alejado de cualquier locus *mce* o transportador ABC (Figura 13). Una búsqueda más detallada en genomas de Actinobacterias relacionadas permitió observar que de hecho ninguno de los operones *mce* de especies micobacterianas poseen una ATPasa cercana (Tabla 5) sin embargo, sí se identificaron genes candidatos en el extremo 5' de operones *mce* en las especies de Actinobacterias analizadas que no son micobacterias (Tabla 6).

Aunque como ya se ha comentado ninguna de las ATPasas de micobacterias se localizan genómicamente cerca de transportadores ABC, merece la pena destacar que dentro de las especies de *Mycobacterium* analizadas (*M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *M. bovis*), en todos los casos el gen *mceG* se encuentra en la región genómica que codifica la

mayoría de las proteínas ribosomales y más concretamente entre los genes ribosomales *rpoB/rpoC* y *rplJ/rplL* (Tabla 5). De hecho, en *M. leprae* la proximidad de este gen a los genes de la ARN polimerasa *rpo* llevó a especular que esta ATPasa podría estar implicada en el transporte de ribonucleótidos (Honoré N *et al.*, 1993).

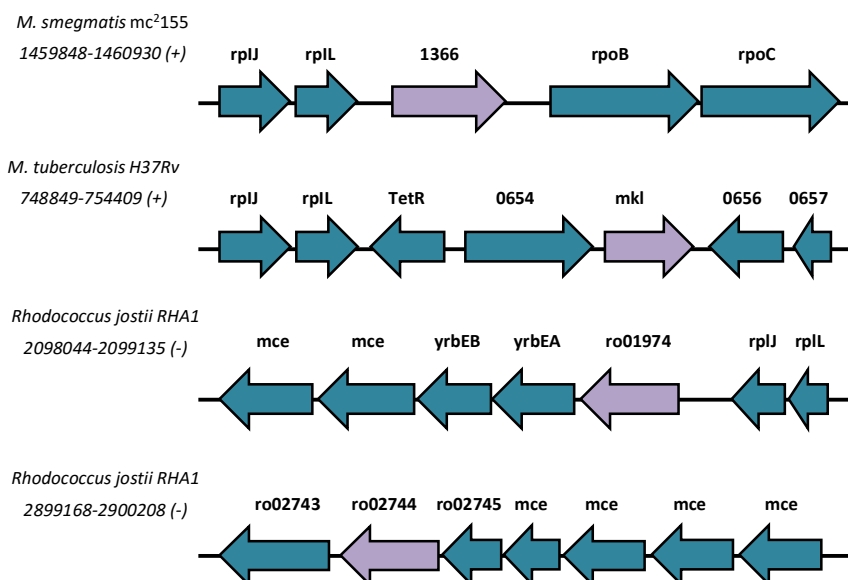


Figura 13. Representación esquemática de las regiones génicas donde se encuentran localizados los genes que codifican la ATPasa MceG de *M. smegmatis* mc²155, *M. tuberculosis* H37Rv y *R. jostii* RHA1.

Es interesante destacar aquí que mientras que las ATPasas Mkl tanto de *M. smegmatis* como de *M. tuberculosis* se encuentran alejadas de cualquier *loci mce*, las dos posibles ATPasas identificadas *in silico* en *R. jostii* se encuentran adyacentes a un operón *mce* (Figura 13). Mientras que la implicación de la ATPasa Mkl de *M. tuberculosis* ha sido relacionada directamente con el sistema de transporte de colesterol y por tanto con el operón *mce4*, ninguna de las dos ATPasas identificadas en *R. jostii* ha sido estudiada funcionalmente. El hecho de que en este último organismo existan dos genes codificantes para ATPasas y que ambos se encuentren adyacentes a un operón *mce*, indica que una probable necesidad de cercanía genética para el correcto funcionamiento de los sistemas Mce en *R. jostii* que por tanto, el mecanismo utilizado por *Rhodococcus* pueda ser diferente al descrito hasta el momento en *M. tuberculosis*.

<i>M. smegmatis</i>			<i>M. tuberculosis</i>			<i>M. leprae</i>			<i>M. bovis</i>		
MSMEG_1339	rpmG	Rv0634	rpmG2	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadA	ML1877	tuf	Mb0653	rpmG	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadA	Mb0654	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadB
MSMEG_1340	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadA	Rv0635	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadB	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1878	rpsG	Mb0655	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0656	tRNA-Trp
MSMEG_1341	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadB	Rv0636	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1879	pseudogen	Mb0657	secE	secE	Mb0658	nusG
MSMEG_1342	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Rv0637	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1880	pseudogen	Mb0659	rplK	rplK	Mb0660	rplA
MSMEG_1343	tRNA-Trp	Rv0638	secE1	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1881	pseudogen	Mb0661	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0662	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1344	secE	Rv0639	nusG	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1882	pseudogen	Mb0663	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0664	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1345	nusG	Rv0640	rplK	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1883	pseudogen	Mb0665	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0666	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1346	rplK	Rv0641	rplA	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1884	pseudogen	Mb0667	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0668	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1347	rplA	Rv0642	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1885	pseudogen	Mb0669	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0670	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1348	Factor sigma ECF asociado a ARN polimerasa	Rv0643	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1886	pseudogen	Mb0671	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0672	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1349	Proteína con dominio DGP	Rv0644	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1887	pseudogen	Mb0673	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0674	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1350	Sintasa de ácidos grasos ciclopropano	Rv0645	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1888	pseudogen	Mb0675	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0676	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1351	Sintasa de ácidos grasos ciclopropano	Rv0646	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1889	pseudogen	Mb0677	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0678	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1352	alfa/beta hidrolasa	Rv0647	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1890	pseudogen	Mb0679	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0680	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1353	Transportador ABC	Rv0648	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1891	pseudogen	Mb0681	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0682	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1354	pseudogen	Rv0649	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1892	pseudogen	Mb0683	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0684	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1355	Regulador transcripcional familia TetR	Rv0650	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1893	pseudogen	Mb0685	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0686	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1356	Proteína hipotética	Rv0651	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1894	pseudogen	Mb0687	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0688	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1357	Proteína hipotética	Rv0652	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1895	pseudogen	Mb0689	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0690	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1358	Proteína hipotética	Rv0653	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1896	pseudogen	Mb0691	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0692	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1359	Regulador transcripcional familia DeoR	Rv0654	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1897	pseudogen	Mb0693	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0694	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1360	endonucleasa/exonucleasa/fosfatasa	Rv0655	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1898	pseudogen	Mb0695	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0696	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1361	alfa-manosidasa	Rv0656	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1899	pseudogen	Mb0697	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0698	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1362	Proteína hipotética	Rv0657	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1900	pseudogen	Mb0699	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0700	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1363	Glucosidasa	Rv0658	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1901	pseudogen	Mb0701	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0702	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1364	rplJ	Rv0659	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1902	pseudogen	Mb0703	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0704	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1365	rplL	Rv0660	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1903	pseudogen	Mb0705	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0706	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1366	mkl	Rv0661	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1904	pseudogen	Mb0707	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0708	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1367	rpoB	Rv0662	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1905	pseudogen	Mb0709	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0710	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1368	rpoC	Rv0663	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1906	pseudogen	Mb0711	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0712	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1369	Regulador transcripcional LacI	Rv0664	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1907	pseudogen	Mb0713	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0714	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1370	D-arabinol deshidrogenasa	Rv0665	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1908	pseudogen	Mb0715	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0716	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1371	Proteína hipotética	Rv0666	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1909	pseudogen	Mb0717	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0718	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1372	Proteína de unión a ATP (ABC)	Rv0667	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1910	pseudogen	Mb0719	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0720	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1373	Permeasa transportador ribosa	Rv0668	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1911	pseudogen	Mb0721	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0722	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC
MSMEG_1374	SBP transportador ribosa	Rv0669	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	ML1912	pseudogen	Mb0723	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC	Mb0724	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadC

Tabla 5. Análisis de la región genómica del gen *mkl* en diferentes especies de *Mycobacterium*. Se muestra en sombreado azul el gen correspondiente al gen *mkl* y se destacan en negrita los genes ribosomales cuya posición se mantiene en las distintas especies.

<i>R. jostii</i> RHAI		<i>R. jostii</i> RHAI		<i>R. jostii</i> RHAI		<i>S. coelicolor</i>		<i>N. farcinica</i>	
<i>RHA1 ro01960</i>	peptidasa	<i>RHA1 ro02734</i>	acetil-CoA acetiltransferasa	<i>SCO2407</i>	aldosa 1-epimerasa	<i>nfa50940</i>	proteína hipotética		
<i>RHA1 ro01961</i>	rpoC	<i>RHA1 ro02735</i>	3-oxoacil-ACP reductasa	<i>SCO2408</i>	amino transferasa	<i>nfa50950</i>	regulador transcripcional		
<i>RHA1 ro01962</i>	rpoB	<i>RHA1 ro02736</i>	acyl CoA deshidrogenasa	<i>SCO2409</i>	proteína hipotética asociada a Mce	<i>nfa50960</i>	proteína hipotética		
<i>RHA1 ro01963</i>	proteína hipotética	<i>RHA1 ro02737</i>	3-oxoacil-ACP reductase	<i>SCO2410</i>	proteína hipotética asociada a Mce	<i>nfa50970</i>	proteína hipotética		
<i>RHA1 ro01964</i>	mce	<i>RHA1 ro02738</i>	proteína hipotética	<i>SCO2411</i>	proteína hipotética asociada a Mce	<i>nfa50980</i>	rpoC		
<i>RHA1 ro01965</i>	mce	<i>RHA1 ro02739</i>	importador dependiente de Na+	<i>SCO2412</i>	proteína hipotética asociada a Mce	<i>nfa50990</i>	rpoB		
<i>RHA1 ro01966</i>	mce	<i>RHA1 ro02740</i>	tiosterasa	<i>SCO2413</i>	proteína hipotética asociada a Mce	<i>nfa51000</i>	proteína hipotética asociada a Mce		
<i>RHA1 ro01967</i>	mce	<i>RHA1 ro02741</i>	proteína hipotética	<i>SCO2414</i>	proteína hipotética asociada a Mce	<i>nfa51010</i>	proteína hipotética asociada a Mce		
<i>RHA1 ro01968</i>	mce	<i>RHA1 ro02742</i>	proteína hipotética	<i>SCO2415</i>	proteína hipotética asociada a Mce	<i>nfa51020</i>	mce5F		
<i>RHA1 ro01969</i>	mce	<i>RHA1 ro02743</i>	proteína hipotética	<i>SCO2416</i>	proteína hipotética asociada a Mce	<i>nfa51030</i>	mce5E		
<i>RHA1 ro01970</i>	mce	<i>RHA1 ro02744</i>	mkl	<i>SCO2417</i>	proteína hipotética asociada a Mce	<i>nfa51040</i>	mce5D		
<i>RHA1 ro01971</i>	mce	<i>RHA1 ro02745</i>	mce	<i>SCO2418</i>	proteína hipotética asociada a Mce	<i>nfa51050</i>	mce5C		
<i>RHA1 ro01972</i>	proteína hipotética	<i>RHA1 ro02746</i>	mce	<i>SCO2419</i>	proteína hipotética asociada a Mce	<i>nfa51060</i>	mce5B		
<i>RHA1 ro01973</i>	permeasa mce	<i>RHA1 ro02747</i>	mce	<i>SCO2420</i>	permeasa ABC	<i>nfa51070</i>	mce5A		
<i>RHA1 ro01974</i>	mkl	<i>RHA1 ro02748</i>	mce	<i>SCO2421</i>	permeasa ABC	<i>nfa51080</i>	yrbE5B		
<i>RHA1 ro01975</i>	rplL	<i>RHA1 ro02749</i>	mce	<i>SCO2422</i>	Mkl	<i>nfa51090</i>	yrbE5A		
<i>RHA1 ro01976</i>	rplJ	<i>RHA1 ro02750</i>	mce	<i>SCO2423</i>	proteína hipotética	<i>nfa51100</i>	Mkl		
<i>RHA1 ro01977</i>	bomba de expulsión	<i>RHA1 ro02751</i>	mce	<i>SCO2424</i>	proteína hipotética	<i>nfa51110</i>	rplL		
<i>RHA1 ro01978</i>	rplA	<i>RHA1 ro02752</i>	proteína hipotética	<i>SCO2425</i>	proteína hipotética	<i>nfa51120</i>	rplJ		
<i>RHA1 ro01979</i>	rplK	<i>RHA1 ro02753</i>	sintasa DHBP	<i>SCO2426</i>	proteína regulatoria	<i>nfa51130</i>	transportador		
<i>RHA1 ro01980</i>	nusG	<i>RHA1 ro02754</i>	deshidrogenasa acil-CoA	<i>SCO2427</i>	arabinasa	<i>nfa51140</i>	rplA		
<i>RHA1 ro01981</i>	secE	<i>RHA1 ro02755</i>	proteína hipotética	<i>SCO2428</i>	proteína de unión a fosfato	<i>nfa51150</i>	rplK		
<i>RHA1 ro01982</i>	tRNA-Trp	<i>RHA1 ro02756</i>	proteína hipotética	<i>SCO2429</i>	proteína hipotética	<i>nfa51160</i>	nusG		
<i>RHA1 ro01983</i>	hidroxiacil-ACP deshidratasa HadB	<i>RHA1 ro02757</i>	transposasa	<i>SCO2430</i>	beta-galactosidasa	<i>nfa51170</i>	secE		
<i>RHA1 ro01984</i>	proteína hipotética	<i>RHA1 ro02758</i>	transposasa	<i>SCO2431</i>	alpha-L-arabinofuranosidasa	<i>nfa80490</i>	tRNA-Trp		
<i>RHA1 ro01985</i>	rpmG	<i>RHA1 ro02759</i>	transposasa	<i>SCO2432</i>	permeasa transportador azúcar	<i>nfa51180</i>	proteína hipotética		
<i>RHA1 ro01986</i>	tRNA-Met	<i>RHA1 ro02760</i>	transposasa	<i>SCO2433</i>	permeasa transportador azúcar	<i>nfa51190</i>	rpmG		
<i>RHA1 ro01987</i>	tRNA-Thr	<i>RHA1 ro02761</i>	transposasa	<i>SCO2434</i>	SBP transportador azúcar	<i>nfa80500</i>	tRNA-Met		
<i>RHA1 ro01988</i>	tRNA-Tyr	<i>RHA1 ro02762</i>	proteína hipotética	<i>SCO2435</i>	proteína hipotética	<i>nfa80510</i>	tRNA-Thr		
<i>RHA1 ro01989</i>	proteína de unión a nucleótido	<i>RHA1 ro02763</i>	proteína hipotética	<i>SCO2436</i>	proteína hipotética	<i>nfa80520</i>	tRNA-Tyr		
<i>RHA1 ro01990</i>	HtpX	<i>RHA1 ro02764</i>	proteína hipotética	<i>SCO2437</i>	proteína hipotética	<i>nfa51200</i>	proteína de unión a nucleótido		
<i>RHA1 ro01991</i>	poliprenil sintasa	<i>RHA1 ro02765</i>	proteasa Ctp unión a ATP	<i>SCO2438</i>	proteína hipotética	<i>nfa51210</i>	HtpX		
<i>RHA1 ro01992</i>	deshidrogenasa	<i>RHA1 ro02766</i>	proteína hipotética	<i>SCO2439</i>	proteína de unión a calcio	<i>nfa51220</i>	poliprenil sintasa		
<i>RHA1 ro01993</i>	ubiE	<i>RHA1 ro02767</i>	factor anti-sigma	<i>SCO2440</i>	regulador transcripcional	<i>nfa51230</i>	flavoproteína		
<i>RHA1 ro01994</i>	succinato deshidrogenasa	<i>RHA1 ro02768</i>	proteína hipotética	<i>SCO2441</i>	proteína hipotética	<i>nfa51240</i>	regulador transcripcional		
<i>RHA1 ro01995</i>	glicosil transferasa	<i>RHA1 ro02769</i>	proteína hipotética	<i>SCO2442</i>	regulador GntR	<i>nfa51260</i>	proteína hipotética		

Tabla 6. Análisis de la región genómica del gen *mkl* en diferentes especies de Actinobacterias diferentes a *Mycobacterium*. Se muestra en sombreado azul el gen correspondiente al gen *mkl* y se destacan en negrita los genes ribosomales cuya posición se mantiene en las distintas especies.

La secuencia del gen *MSMEG_1366* contiene los siete motivos altamente conservados que se identifican en las ATPasas ABC, entre ellos los motivos Walker A y Walker B esenciales para la unión del ATP, así como el denominado loop-C (LSGGQ) muy conservado también en este tipo de transportadores (Figura 29). Además, en los análisis transcriptómicos realizados en nuestro laboratorio mediante el uso de micromatrices de hibridación de DNA, se observó que el gen *MSMEG_1366* se encuentra inducido 7.8 veces en las bacterias que crecen en presencia de colesterol respecto a las crecidas en un medio que solo contiene glicerol como fuente de carbono (Uhía *et al.*, 2012). Estas observaciones tanto de homología de secuencia como de nivel de expresión del gen *MSMEG_1366* lo relacionaban directamente con sistemas de transporte de tipo ABC implicados particularmente en el metabolismo de colesterol, convirtiéndolo por tanto en el mejor candidato para codificar la ATPasa de los sistemas Mce en *M. smegmatis*.

1.1.1. Estimación de la interacción proteica del gen *MSMEG_1366* mediante análisis bioinformáticos.

Con el fin de analizar las relaciones funcionales del gen *MSMEG_1366* en el contexto genómico de *M. smegmatis* se utilizó el software bioinformático STRING. Este software utiliza la hipótesis de que dentro de una red, aquellas proteínas que están involucradas en un mismo proceso biológico tienden a presentar alta conectividad. Las redes generadas por STRING, además de representar interacciones directas (físicas) entre proteínas, también incluyen interacciones indirectas (funcionales), es decir, proteínas que comparten vías metabólicas, proteínas co-reguladas a nivel transcripcional y proteínas que participan en un complejo multiproteico. Así, aunque la red de interacción propuesta puede no representar el total de las proteínas asociadas con el gen *MSMEG_1366*, sí nos ofrece indicios de qué interacciones están sucediendo.

En la Figura 14 se muestra la red de interacción obtenida mediante STRING para el gen *MSMEG_1366* aplicando un valor de confianza entre 0.7 (confianza alta) y 0.9 (máxima confianza). Como puede observarse, la predicción relaciona el gen *mceG* con diez genes diferentes pertenecientes todos ellos a los componentes permeasas de los seis operones *mce* presentes en *M. smegmatis*. Para cada pareja de genes la mayoría de las interacciones propuestas corresponden a hechos de co-existencia en diferentes genomas, resultado que indica que existe una relación entre ambos genes ya que se repite la presencia de proteínas homólogas en diferentes especies. Un análisis más detallado de estas interacciones muestra que el mayor grado de conservación de proteínas homólogas se encuentra en la familia de Actinomycetales y especialmente en el suborden Corynebacterineae, que incluye las especies *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *Corynebacterium efficiens*, *R. jostii*, *N. farcinica* y *Gordonia bronchialis*. Entre los genes mostrados en la red de interacción, existen proteínas con un grado de homología de entre el 70-90% en los organismos anteriormente descritos excepto en *C. efficiens*, donde este porcentaje disminuye significativamente. Este resultado coincide con los datos mostrados por

Casali *et al.* (2007), donde los autores indican que de las especies del suborden Corynebacterineae analizadas, ninguna especie de *Corynebacterium* posee proteínas Mce.

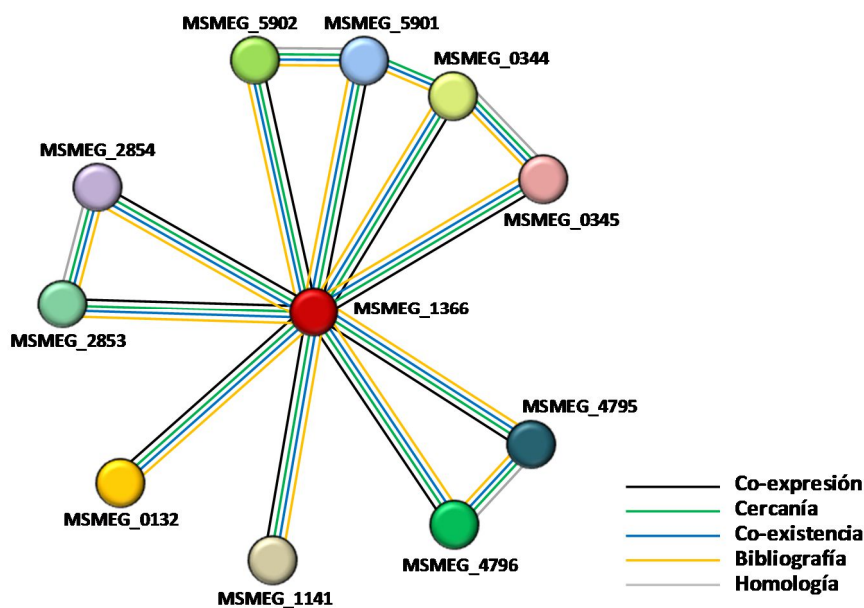


Figura 14. Representación gráfica de la red de interacción de la proteína MSMEG_1366 (denominadas según la abreviatura del gen), utilizando el programa STRING. Los nodos del gráfico representan las proteínas, mientras que los enlaces que unen los distintos nodos indican las relaciones existentes entre ellas, indicadas en la leyenda. Se omitieron los nodos que no presentaban ninguna conexión. El conjunto de datos se limita al organismo *M. smegmatis*. El valor de confianza aplicado fue 0.7 (confianza alta).

1.2. Análisis de la expresión génica del gen *MSMEG_1366* (*mceG*) mediante qRT-PCR

Los análisis de transcriptómica de *M. smegmatis* demostraron que un total de 89 genes se encuentran inducidos en presencia de colesterol, pero que únicamente 52 de ellos poseen secuencias operadoras consenso capaces de reconocer los reguladores KstR1 o KstR2 (Uhía *et al.*, 2012). Por lo tanto, los restantes 37 genes inducidos en colesterol se asume que deben estar controlados por mecanismos reguladores alternativos, probablemente relacionados con procesos de estrés o con otras respuestas metabólicas globales.

El gen *MSMEG_1366* se encuentra constituyendo una única unidad de transcripción sin ningún gen regulador localizado en su vecindad. De hecho, la región 5' de este gen no contiene las secuencias consenso reconocidas por las dos proteínas reguladoras que controlan el metabolismo de colesterol en *M. smegmatis* (KstR y KstR2) y tampoco se observa ninguna secuencia palindrómica que pudiera indicar la existencia de una región operadora convencional. Este análisis *in silico* sugería por tanto en un principio que el gen *MSMEG_1366* podría

expresarse de manera constitutiva. Sin embargo y como ya hemos comentado anteriormente, los análisis transcriptómicos globales realizados anteriormente en nuestro laboratorio mediante el uso de micromatrices de hibridación de DNA mostraron que el gen *MSMEG_1366* se encuentra inducido 7.8 veces en las células crecidas en un medio con colesterol (Uhía *et al.*, 2012).

Mediante qRT-PCR hemos investigado si el gen *mceG* se expresa constitutivamente a través de la comparación de la abundancia del transcrito en células crecidas en medio mínimo con glicerol (medio control) o con colesterol (medio de inducción), en ambos casos utilizados como única fuente de carbono y energía. Los resultados mostrados en la Figura 15 indican que el gen *mceG* se expresa a niveles muy altos en medio con colesterol comparado con la expresión obtenida en glicerol, observándose una inducción de este gen de casi tres veces. Este dato confirma por tanto las observaciones realizadas con los *microarrays*.

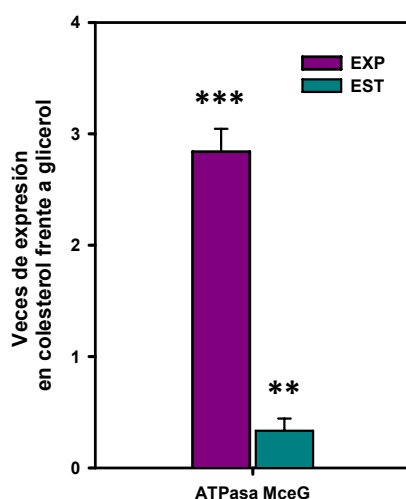


Figura 15. Análisis de la expresión diferencial de la ATPasa MceG (gen *MSMEG_1366*) en la cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155. En la gráfica se representa la expresión de los genes en colesterol con respecto a la expresión de los mismos en glicerol. La expresión de cada uno de los genes es a su vez relativa a la expresión del gen *MSMEG_2758* (*sigA*) empleado como control interno. Los valores corresponden a la media de tres réplicas biológicas independientes. Los asteriscos muestran la significancia usando el estadístico de análisis de varianza ANOVA y el test Student-Newman-Keuls: $P < 0.001$ (***) y $P < 0.01$ (**).

Dado que anteriormente se había descrito que la expresión de los operones *mce* varía en función de la fase de crecimiento en la que se encuentre el cultivo (Kumar *et al.*, 2003), se decidió también comprobar la expresión del gen *MSMEG_1366* en la fase de crecimiento donde el cultivo deja la fase exponencial para iniciar la fase estacionaria. Los resultados de este estudio indicaron que en esta fase de crecimiento existe una mayor expresión del gen en el medio que contenía glicerol comparado con el medio que contenía colesterol (ratio colesterol/glicerol < 1)

(Figura 15), sugiriendo que la ATPasa podría estar respondiendo en esta fase a las necesidades energéticas de alguno de los otros operones *mce* presentes en la célula.

1.3. Estudio mutacional de la ATPasa MceG

Con el fin de validar los datos de expresión obtenidos mediante qRT-PCR y poder conocer mejor la función del gen *MSMEG_1366*, se llevó a cabo la delección del mismo utilizando el plásmido suicida pJQ200x (apartado 4.6. de materiales y métodos). Cuando el mutante *M. smegmatis* $\Delta 1366$ se cultivó en medio mínimo con colesterol 1.8 mM como única fuente de carbono y energía, se observó que en estas condiciones el mutante es incapaz de crecer incluso a tiempos largos de incubación (120 h) (Figura 16). Este resultado, confirmaba la implicación del gen *MSMEG_1366* en el metabolismo del colesterol. A diferencia de lo que sucede en *M. tuberculosis* (Pandey y Sassetti, 2008), la capacidad de crecimiento en colesterol parece además no recuperarse con el tiempo.

Con el objetivo de demostrar que el fenotipo de crecimiento observado era debido únicamente a la delección de la ATPasa, el mutante $\Delta 1366$ se complementó con la construcción pMV1366 derivada del plásmido pMV261 que porta una copia del gen *MSMEG_1366* (*mceG*) bajo el control de un promotor constitutivo en micobacterias (Tabla 3). En la Figura 16, se muestra cómo el mutante complementado con dicha construcción recupera los niveles de crecimiento en colesterol de la cepa silvestre mientras que el mutante que porta el plásmido vacío no presenta crecimiento, demostrando así que la expresión de la ATPasa MceG restaura el consumo de colesterol en *M. smegmatis*.

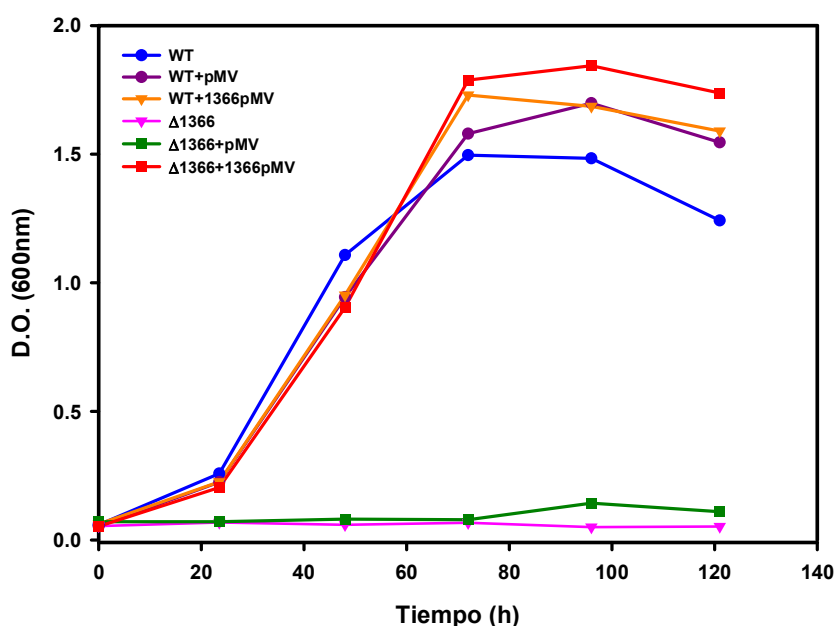


Figura 16. Curvas de crecimiento de la cepa *M. smegmatis* mc²155 y la cepa *M. smegmatis* $\Delta 1366$ (mutante de delección de la ATPasa MceG) en colesterol 1.8 mM como única fuente de carbono y energía. Los valores representados corresponden a la media de tres réplicas biológicas independientes.

Para comprobar si el hecho de disponer copias adicionales de la ATPasa MceG como consecuencia de su expresión en el plásmido pMV1366 podría suponer un aumento o mejora en el transporte de colesterol en *M. smegmatis*, se electroporó la construcción pMV1366 en la cepa silvestre. Los resultados mostraron que la cepa recombinante *M. smegmatis* (pMV1366) no presentaba ninguna mejora en la velocidad de crecimiento en colesterol comparada con la cepa salvaje transformada con el plásmido pMV261 vacío, sugiriendo que el nivel de expresión de la ATPasa en la célula no constituye el cuello de botella principal en el metabolismo del colesterol aunque como hemos visto sea imprescindible (Figura 16).

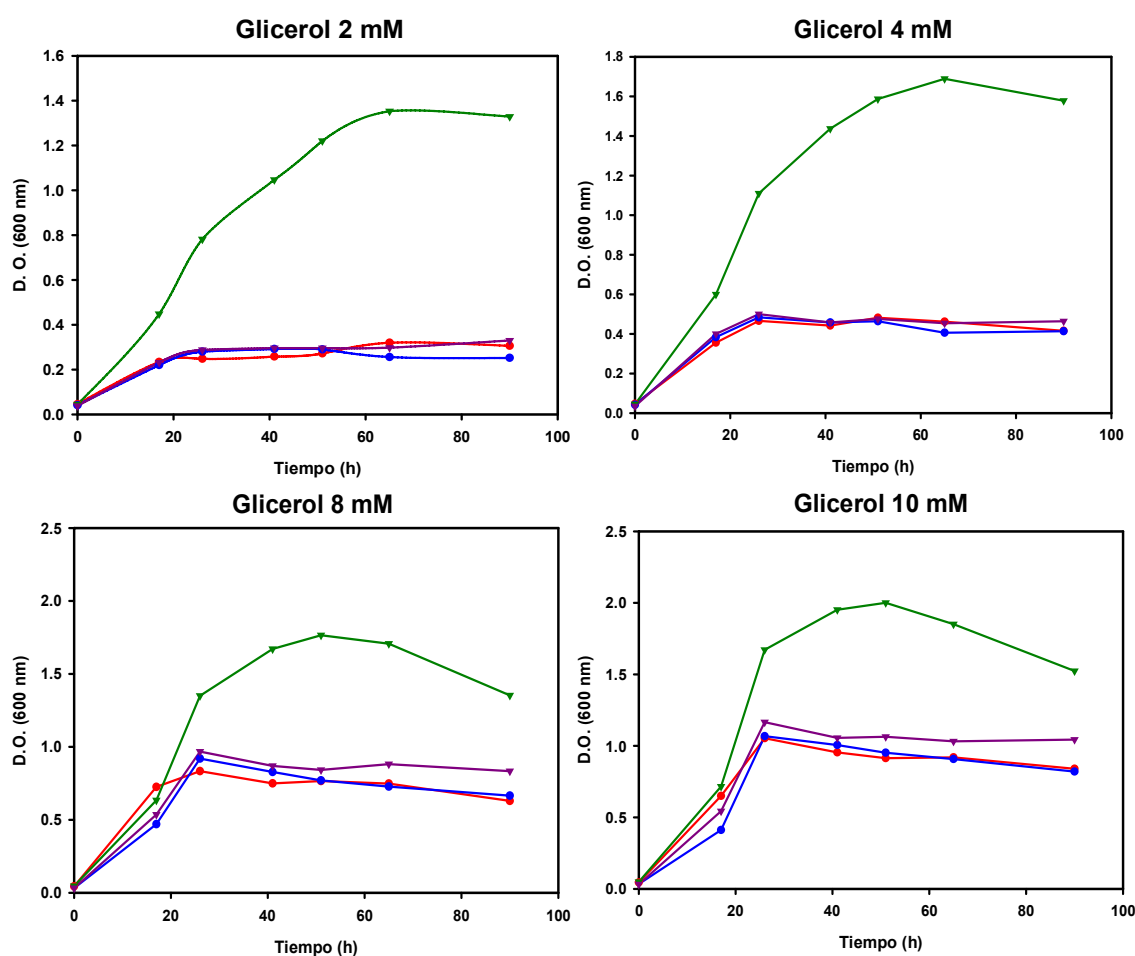


Figura 17. Curvas de crecimiento en medio mínimo con diferentes concentraciones de glicerol de la cepa *M. smegmatis* mc²155 (líneas rojas) y la cepa mutante Δ1366 (líneas azules) o suplementando este mismo medio con colesterol 1.8 mM (líneas verdes para *M. smegmatis* mc²155 y líneas moradas para la cepa mutante Δ1366). Los valores representados corresponden a la media de tres réplicas biológicas independientes.

A la vista de estos resultados, nos propusimos investigar si el sistema de transporte de colesterol podría ser energizado por alguna otra ATPasa de otros sistemas ABC distinta de la

ATPasa MceG si se utilizaba una fuente de carbono adicional al colesterol. Para ello, *M. smegmatis* fue cultivado en medio mínimo con 1.8 mM de colesterol suplementado con concentraciones crecientes de glicerol (2 mM, 4 mM, 8 mM y 10 mM). Los resultados indicaron que el mutante $\Delta 1366$ crecía en un medio con colesterol y glicerol a una D.O. final idéntica a la obtenida en el medio que contenía únicamente glicerol como fuente de carbono, mientras que en las mismas condiciones, la cepa silvestre mostró un claro co-metabolismo de ambos sustratos (Figura 17). Este resultado confirma que el disponer de una fuente de carbono y energía adicional no supone la activación de sistemas de transporte de colesterol alternativos en el mutante y sugiere una dependencia total de la ATPasa MceG para el transporte de colesterol.

Como ya se comentó en la Introducción, los genes del operón *mce4* se encuentran regulados por el represor transcripcional KstR. Para comprobar si el fenotipo del mutante $\Delta 1366$ era debido a la falta de expresión del operón *mce4*, se creó un doble mutante de *M. smegmatis* $\Delta KstR/\Delta 1366$ mediante el uso del plásmido suicida pJQ200x usado sobre la cepa $\Delta 1366$. El objetivo de este experimento era comprobar si la ausencia de crecimiento observada era debida a que la mutación de la ATPasa no permitía ningún tipo de transporte de colesterol al interior celular o si estaba teniendo lugar cierto transporte, pero no de manera suficiente como para permitir la inducción de los genes de metabolismo del colesterol y por tanto, el crecimiento de la cepa en este esteroide. Como puede observarse en la Figura 18, el doble mutante desregulado no mostró ninguna mejora de crecimiento en colesterol con respecto al mutante simple de la ATPasa. Este resultado sugiere que aún incluso si existe cierto grado de transporte pasivo de colesterol, éste no es suficiente como para permitir el crecimiento de la bacteria y por tanto, que solo la delección del gen *MSMEG_1366* es la responsable de que la bacteria no pueda crecer en colesterol.

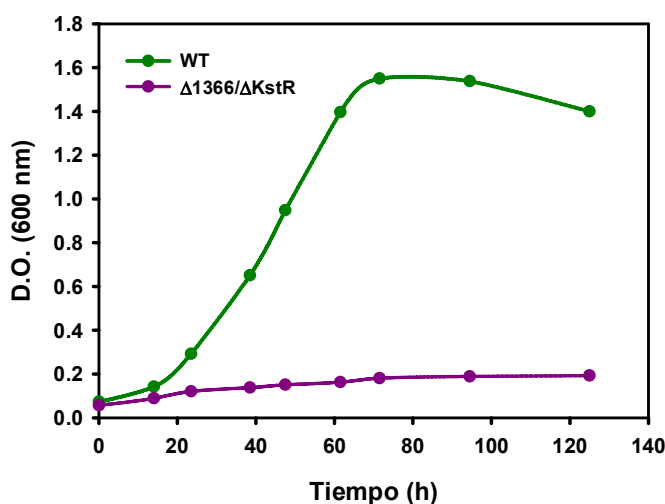


Figura 18. Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* mc²155 y la cepa *M. smegmatis* $\Delta 1366/\Delta KstR$ (mutante de delección doble de la ATPasa MceG y el regulador transcripcional KstR) en colesterol 1.8 mM como única fuente de carbono y energía. Los valores representados corresponden a la media de tres réplicas biológicas independientes.

Estos resultados de crecimiento, similares a los obtenidos en *R. jostii* RHAI (Mohn *et al.*, 2008), diferían con los obtenidos en *M. tuberculosis*, en los que como se ha comentado el sistema Mce4 parece no ser esencial para el crecimiento en colesterol a tiempos largos de incubación (Pandey y Sassetti, 2008). La única diferencia existente entre los diversos experimentos parecía ser la concentración de colesterol usada y por tanto, también el porcentaje de tyloxapol. Con el fin de intentar reproducir los ensayos realizados en *M. tuberculosis*, la cepa $\Delta 1366$ se cultivó junto a la cepa silvestre en concentraciones comprendidas entre 0.5-1.8 mM de colesterol. Los resultados mostraron un leve crecimiento del mutante $\Delta 1366$ a tiempos largos de cultivo (120 h) que en ningún caso alcanzó al de la cepa silvestre (datos no mostrados).

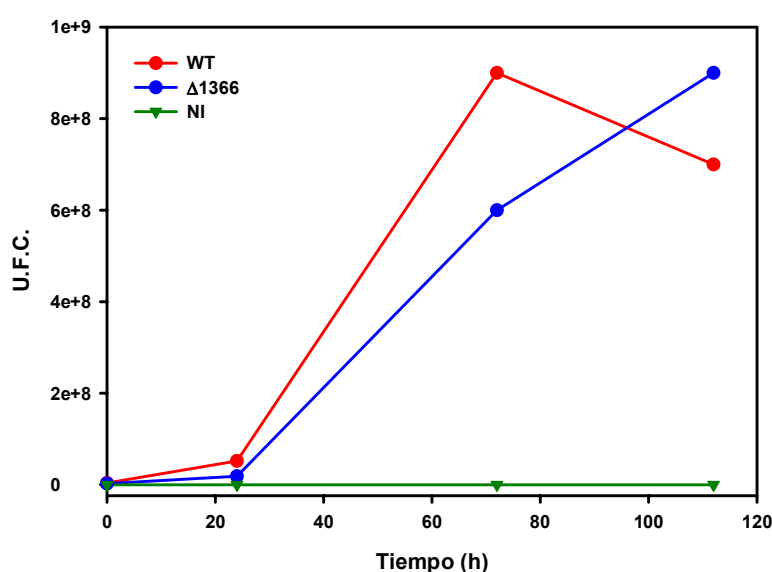


Figura 19. Medida de las unidades formadoras de colonia (U.F.C.) tanto de la cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 como de la cepa mutante $\Delta 1366$. Las cepas fueron cultivadas en medio mínimo al que se le añadió colesterol en escamas a una concentración final de 1.8 mM. NI se refiere al control de medio sin inocular.

La prueba de crecimiento en condiciones saturantes de colesterol, conseguidas mediante la adición directa del esteroide al medio a una concentración final de 1.8 mM y sin ningún tipo de agente solubilizante, mostró un crecimiento del mutante $\Delta 1366$ prácticamente idéntico a la cepa silvestre (Figura 19). El conjunto de estos resultados sugiere que en condiciones saturantes, el colesterol es capaz de transportarse al interior bacteriano probablemente a través de mecanismos de difusión pasiva. La necesaria presencia de agentes solubilizantes como el tyloxapol para realizar los estudios con este tipo de compuestos podría disminuir la cantidad biodisponible del colesterol hasta alcanzar niveles en los que es necesario un transporte activo para internalizarlo y usarlo como fuente de carbono. Teniendo en cuenta estas conclusiones, los

estudios posteriores enfocados a estudiar el sistema Mce4 se realizaron en condiciones de necesidad de transporte activo de colesterol.

Aprovechando el rango de sustratos esteroideos en los que sabemos que es capaz de crecer *M. smegmatis* y con el propósito de comprobar si la delección del gen *MSMEG_1366* impedía la utilización de alguno de ellos, se cultivaron tanto el mutante $\Delta 1366$ como la cepa silvestre en medio mínimo con 1.8 mM de colesteno, 1 mM de fitosteroles o 2.5 mM de androstenediona (AD) como única fuente de carbono y energía. Los resultados mostraron que al igual que ocurría con el colesterol, el mutante fue incapaz de crecer en colesteno (Figura 20 A) o fitosteroles (Figura 20 C) como única fuente de carbono incluso a tiempos largos de incubación. Sin embargo, en el caso del AD como sustrato, el mutante mostró el mismo patrón de crecimiento que la cepa silvestre (Figura 20 B). Hay que señalar aquí que el crecimiento en AD se produce como un fenómeno de adaptación que tiene lugar como consecuencia de la mutación del gen *padR* que abre la ruta del catabolismo del AD. Las cepas adaptadas son capaces de utilizar AD sin la larga fase de latencia. Hay que decir que la cepa $\Delta 1366$ adaptada capaz de crecer en AD no es tampoco capaz de utilizar ni colesterol ni los otros esteroides con cadena lateral larga pero sí progesterona y otros esteroides con cadena lateral corta.

Estos resultados demuestran que los esteroides sin cadena lateral o con cadena lateral corta se transportan por mecanismo independientes de los operones *mce*. Nuestros datos apuntan a que se transportan por simple difusión de forma pasiva.

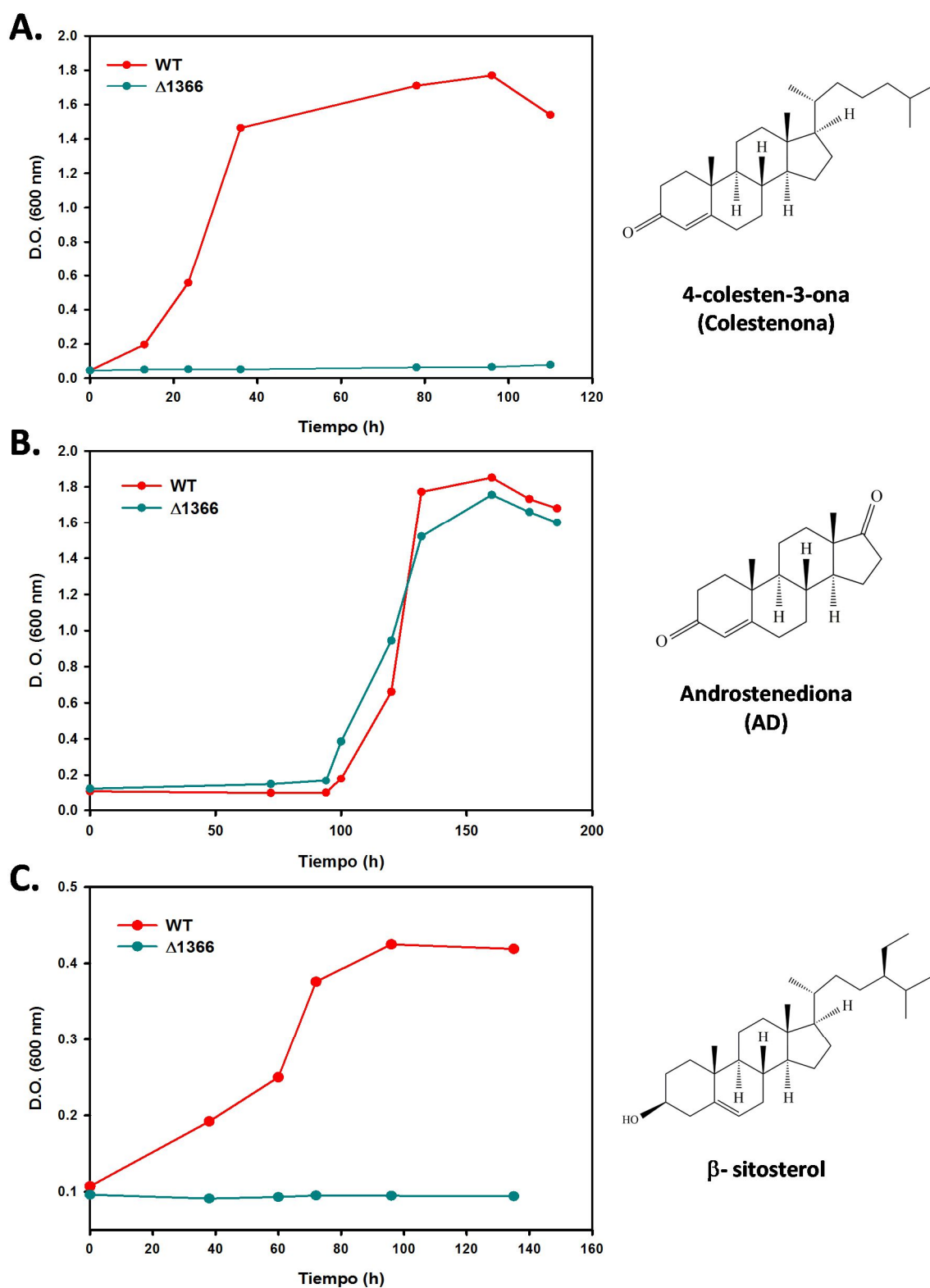


Figura 20. Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* mc²155 y la cepa mutante Δ1366 en A. colesteno 1.8 mM, B. AD 2 mM o C. Mezcla de fitosterolos calculando una concentración de β-sitosterol de 1 mM, como única fuente de carbono y energía. Los valores representados corresponden a la media de tres réplicas biológicas independientes. A la derecha de cada gráfica se representa la estructura del sustrato utilizado en cada caso.

1.3.1. Ensayos de transporte de colesterol con radiactividad

Una vez confirmada la implicación directa del gen *MSMEG_1366* en el metabolismo del colesterol y de otros esteroides relacionados, se procedió a la realización de ensayos de transporte mediante el uso de colesterol marcado con C^{14} para confirmar su implicación directa y específica en el proceso de transporte al interior celular.

Teniendo en cuenta la naturaleza altamente hidrofóbica del colesterol, es difícil discernir en este tipo de ensayos entre el colesterol adsorbido en la envoltura celular y el transportado al interior aún incluso después de varios lavados de las células en presencia de detergentes. Por tanto y para determinar el nivel basal de colesterol que se encuentra unido a la superficie celular, fue necesario llevar a cabo un experimento control con inhibidores de transporte activo (ver apartado 9 de materiales y métodos). Para ello, se incubaron las células durante 10 min con 2 mM de DCCD (N-N' dicitclohexilcarbodiimida). El DCCD se ha utilizado en *M. smegmatis* como inhibidor de las ATPasas dependientes de flujo de protones (inhibidor de la cadena respiratoria) (Agarwal *et al.*, 1983, Parrish *et al.*, 2004, Mohn *et al.*, 2008). Como puede observarse en la Figura 21 A, en presencia de DCCD se observa un aumento de radiactividad con el tiempo de incubación similar para la cepa salvaje y la cepa $\Delta 1366$. En ambos casos se alcanza un valor de aproximadamente 1400 c.p.m. a los 30 min de ensayo. Esta cantidad de radiactividad medida tras la pre-incubación con el DCCD se considera independiente de transporte activo y por tanto se determinó como el nivel basal de adsorción del colesterol a la superficie de *M. smegmatis*.

Como ya se ha mostrado al inicio de este objetivo, el gen *MSMEG_1366* se induce en presencia de colesterol en la fase exponencial de crecimiento, teniendo en cuenta que el nivel de expresión basal de los transportadores ABC no suele ser muy elevado, la inducción previa de los genes suele suponer una mejora en la medida del transporte del sustrato específico. Sin embargo, los intentos de utilizar cultivos inducidos para realizar estos ensayos fueron inútiles ya que no se podía controlar la eliminación del colesterol mediante lavados de las células y siendo por tanto imposible controlar la concentración inicial de colesterol en el ensayo, por lo que el cultivo previo al estudio se realizó en medio mínimo con glicerol 18 mM.

Además, también se debe tener en cuenta que los métodos usados para medir la permeabilidad o el transporte requieren que las células se encuentren en forma de dispersiones unicelulares en contacto con el medio, una propiedad que no se cumple habitualmente en las micobacterias, que tienden a agregarse en medio líquido. La adición al medio de detergentes como por ejemplo el Tween80, usados normalmente en los cultivos en crecimiento para conseguir una distribución celular homogénea, no es recomendable en este tipo de ensayos debido a que modifican la organización de la pared celular (Ortalo-Magné *et al.*, 1996; Camacho *et al.*, 2001). Sin embargo en condiciones de cultivo sin detergente, la cepa mutante

$\Delta 1366$ presentaba una agregación celular en medio líquido mucho mayor que la cepa silvestre y por tanto haciendo imposible controlar la homogeneidad de los cultivos en el ensayo.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, el ensayo de transporte de colesterol se realizó finalmente con células no inducidas de *M. smegmatis* cultivadas en medio mínimo con glicerol 18 mM en presencia de Tween80 al 0.05%. En estas condiciones de ensayo, la cepa silvestre mostró un aumento de la radiactividad dependiente del tiempo alcanzando unas 2750 c.p.m. a los 30 min de incubación. La cepa mutante $\Delta 1366$ también mostró un aumento en la radiactividad, pero los niveles alcanzados fueron de 1450 c.p.m., es decir similares a los obtenidos en presencia de DCCD y por tanto, son debidos únicamente al proceso de adsorción inespecífico de colesterol a la superficie celular y no al proceso de transporte activo (Figura 21 B).

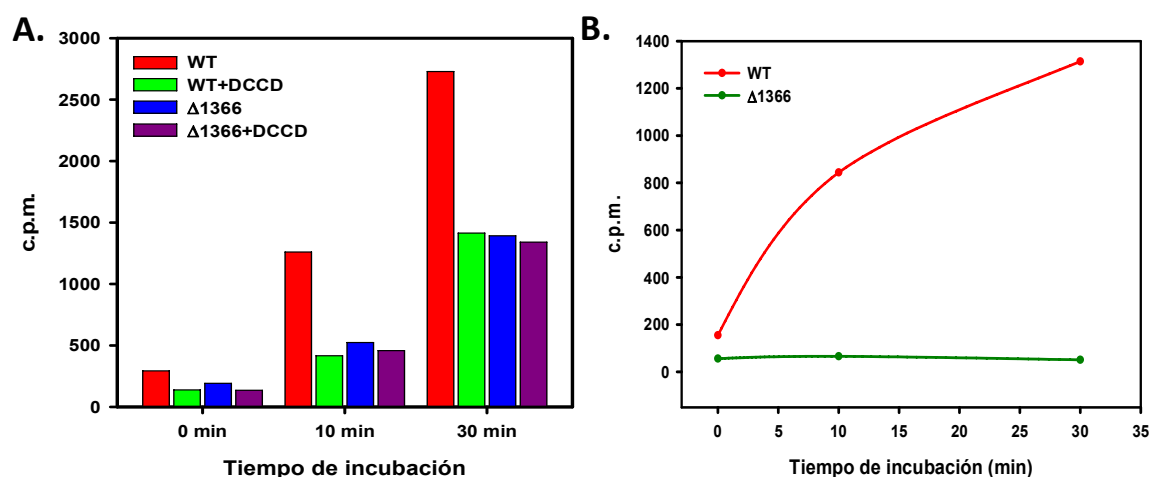


Figura 21. Ensayos de transporte con colesterol radiactivo de la cepa silvestre y el mutante $\Delta 1366$ ($\Delta mceG$). A. Ensayo realizado en presencia de inhibidor DCCD. B. Se muestran los niveles de radiactividad tras restar la radioactividad que aporta el colesterol adherido a la superficie celular (medidas obtenidas en presencia del inhibidor DCCD).

1.4. Estudio fenotípico del mutante *M. smegmatis* $\Delta 1366$

Durante los estudios realizados con el mutante $\Delta 1366$, se observó que la cepa presentaba una elevada agregación durante el cultivo en líquido en comparación con la cepa silvestre. Para verificar si esta mayor agregación era realmente una consecuencia de la mutación, ambas cepas se cultivaron en medio mínimo con glicerol 18 mM sin añadir ningún detergente al medio de cultivo. Como era de esperar, la cepa silvestre presentaba la agregación típica de este tipo de bacterias en medio líquido, mientras que el mutante en la ATPasa MceG mostró una agregación muy superior que no pudo ser eliminada incluso empleando diferentes métodos mecánicos de

disgregación (Figura 22). Este fenotipo característico se revierte usando la cepa mutante $\Delta 1366$ complementada con el plásmido pMV1366 (expresa la ATPasa MceG) en el mismo tipo ensayo. Este experimento confirma la relación directa de la agregación observada con la ausencia de la ATPasa MceG.

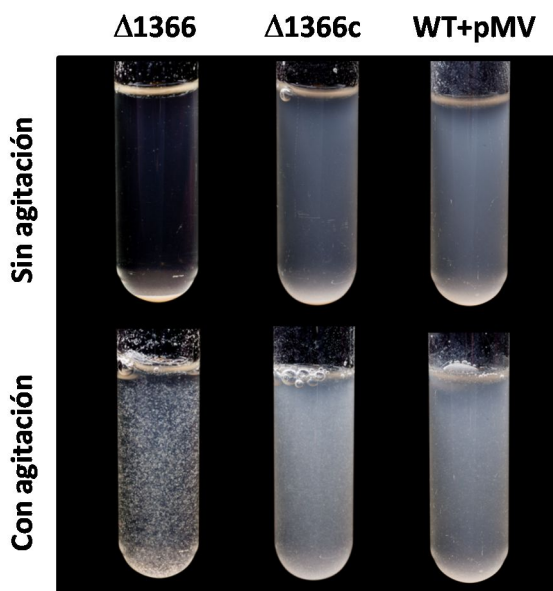


Figura 22. Estudio del fenotipo de agregación de la cepa mutante $\Delta 1366$, la cepa $\Delta 1366c$ que porta la construcción pMV1366 para su complementación y la cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 transformada con el plásmido pMV261 vacío en medio mínimo con glicerol 18 mM en ausencia de detergente.

Para profundizar en la caracterización fenotípica de la cepa mutante $\Delta 1366$, se analizaron el tamaño y la morfología de las colonias obtenidas en placas de 7H10 Middlebrook a las que se le añadió el colorante Rojo Congo. El uso de este colorante mejora la visualización de posibles alteraciones en la morfología de las colonias; y además sirve como un medio para evaluar cambios en el contenido de lípidos y lipoproteínas de la superficie celular (Cangelosi *et al.*, 1999). Sorprendentemente, se observó que el mutante $\Delta 1366$ producía colonias distintivas con pequeñas prolongaciones en su superficie y una coloración más rojiza que la cepa silvestre usada como control (Figura 23).

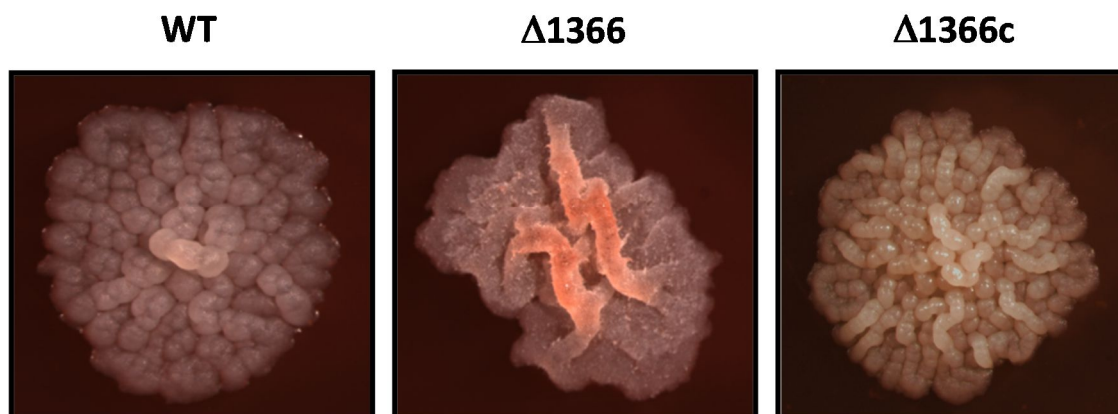


Figura 23. Estudios de morfología de colonia usando el colorante Rojo Congo en placas de 7H10.

Los estudios fenotípicos realizados tanto en medio líquido como en medio sólido, sugieren alteraciones en la hidrofobicidad de la superficie celular del mutante $\Delta 1366$ de naturaleza desconocida pero que se suponen asociados a la pérdida de función de los operones *mce*.

1.5. Análisis de la composición de ácidos micólicos en el mutante *M. smegmatis* $\Delta 1366$

Como ya se ha comentado en la Introducción, existe a día de hoy bibliografía que relaciona la función de los operones *mce* con procesos de transporte de lípidos de membrana asociándolos con procesos de re-modelaje de la misma. Este hecho junto con la observación de los diferentes fenotipos del mutante de la ATPasa MceG, que inactiva la función de todos los operones *mce* presentes en la misma célula, nos llevó a hipotetizar que podríamos encontrar diferencias en los componentes de la pared celular del mutante que explicaran los fenotipos obtenidos hasta el momento.

Klegg *et al.* (2012), realizaron una primera aproximación a este estudio mediante el análisis de diferentes componentes de membrana del séxtuple mutante de los operones *mce* en *M. smegmatis* que a efectos funcionales, sería equiparable con el mutante de la ATPasa *mceG*. En este estudio los autores analizaron mediante análisis por TLC la composición en fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE), cardiolipina (CL), fosfatidilinositol manósidos (PIM), trehalosa monomicolatos (TMM), trehalosa dimicolatos (TDM) o glicopeptidolípidos (GPLs) tanto de la cepa silvestre como del mutante en los 6 operones *mce* sin observar en ninguno de los casos que existieran diferencias significativas entre ambas cepas.

Partiendo de estos estudios previos, nos propusimos investigar posibles cambios en la composición de ácidos micólicos en la cepa mutante *M. smegmatis* $\Delta 1366$. Los ácidos micólicos, son ácidos grasos hidroxilados con una larga cadena de entre 60 y 90 átomos de carbono que se encuentran en las paredes celulares de las bacterias del taxón mycolata. Debido a esta estructura semejante a la cadena lateral presente en algunos de los compuestos esteroideos probados como es el caso del colesterol o los fitosteroles, se planteó la hipótesis de que los operones *mce* podrían estar implicados de alguna manera en el transporte de ácidos micólicos.

Para probar esta hipótesis, se lanzaron cultivos tanto de la cepa silvestre como del mutante *M. smegmatis* $\Delta 1366$ en medio mínimo con glicerol 18 mM más Tween80 y posteriormente se realizó una extracción de los ácidos micólicos de ambas cepas tanto en la fase exponencial de crecimiento (D.O. de aproximadamente 1) como en la fase estacionaria (D.O. de aproximadamente 3.3) (ver apartado 10 de materiales y métodos). Como se observa en la Figura 24, en la TLC realizada para analizar dicha extracción pueden verse las manchas correspondientes a los tres tipos de ácidos micólicos característicos de *M. smegmatis*: α , α' , y epoxi; sin embargo, no se observan diferencias significativas en la abundancia y/o tipo de los mismos entre la cepa silvestre y el mutante *M. smegmatis* $\Delta 1366$ en ninguna de las fases de crecimiento.

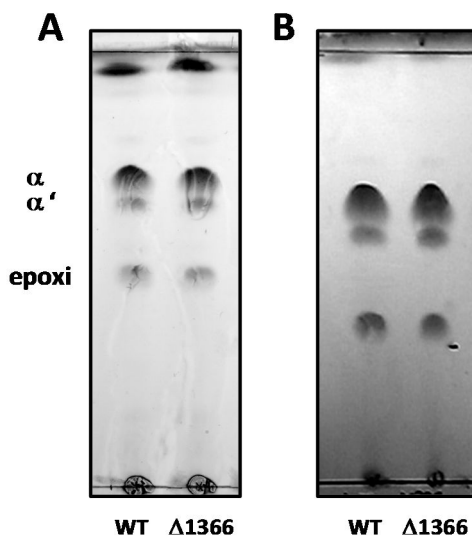


Figura 24. Análisis de los MAMEs (*Mycolic Acid Methyl Esters*) tanto de la cepa silvestre como de la cepa mutante $\Delta 1366$ cultivadas en medio mínimo con glicerol 18 mM. Se muestran los resultados obtenidos tanto en fase exponencial (A) como en fase estacionaria (B) de cultivo.

A la vista de estos resultados y teniendo en cuenta que los operones *mce* podrían estar implicados en procesos de re-modelaje de la pared celular, se planteó la hipótesis de que quizás no se estaba ejerciendo a las células un estrés necesario como para forzar la necesidad de estos

operones y poder observar diferencias significativas en la composición de lípidos y/o ácidos micólicos entre la cepa silvestre y la cepa mutante *M. smegmatis* Δ 1366.

Se sabe que, ante condiciones adversas, las bacterias son capaces de responder con diversos mecanismos de control activos que les permiten hacer frente a dichas condiciones. Uno de estos mecanismos de adaptación bacteriana es la denominada respuesta estricta, que consiste en un complejo conjunto de cambios fisiológicos en respuesta a condiciones de estrés y escasez de nutrientes que permiten la supervivencia de la célula con un metabolismo basal. La respuesta molecular a este tipo de señales de estrés conlleva la síntesis de ppGpp o pppGpp por proteínas de tipo RSH o SAS, que actúan como segundos mensajeros uniéndose directamente a la ARN polimerasa y por tanto alterando los patrones de transcripción.

En *M. tuberculosis*, la respuesta estricta es controlada por una única enzima RSH bifuncional denominada RelA. Dahl *et al.* (2003) describieron que en condiciones de estrés esta proteína no solo coordina la represión del metabolismo bacteriano sino que también afecta a numerosos genes relacionados con factores de virulencia y el re-modelaje de la pared celular. Entre los genes descritos como dependientes de este sistema, señalan que el operón *mce1*, el operón *mce3* y el operón *mce4* de *M. tuberculosis* presentan mayor expresión en la cepa silvestre que en la cepa mutante *M. tuberculosis* Δ RelA, sugiriendo por tanto que la respuesta estricta podría activar los sistemas Mce.

Las Micobacterias acumulan (p)ppGpp y por tanto activan la respuesta estricta en situaciones de carencia de nutrientes total o de carbonos, en presencia de azida sódica y en respuesta del inhibidor de la valina sintasa D,L-norvalina. La carencia de fosfato, la hipoxia y la activación del factor sigma alternativo σ^E , aumentan la transcripción de la proteína Rel, lo que conlleva también una inducción en la síntesis de (p)ppGpp.

A la vista de las diferentes teorías y datos observados, nos planteamos la hipótesis de que los operones *mce* podrían estar implicados en el re-modelaje de componentes de la pared celular ante situaciones de estrés relacionadas con la respuesta estricta. Para probar esta hipótesis e intentar aumentar los niveles de (p)ppGpp, se inocularon cultivos de 45 ml de 7H9 con Tween80 en falcon de 50 ml que se sellaron con parafilm y posteriormente se cultivaron durante cinco días en estático. Estos cultivos crecidos en condiciones de microaerofilia, se usaron como preinóculos de cultivos en medio mínimo con glicerol 18 mM y aeración normal de los que se recogieron muestras para analizar los ácidos micólicos tanto en fase exponencial como en estacionaria. Además y para verificar si los posibles cambios en el patrón de micólicos eran reversibles al aumentar los niveles de oxígeno, este cultivo sirvió a su vez como preinóculo de un segundo también en medio mínimo con glicerol 18 mM y condiciones normales de aeración.

En los resultados de TLC mostrados en la Figura 25 A puede verse que en la fase exponencial del primer cultivo, en la cepa silvestre la banda correspondiente a los epoxi micólicos desaparece sustituyéndose por una nueva banda desconocida de menor Rf y por tanto mayor polaridad. Por el contrario y en las mismas condiciones, el mutante *M. smegmatis* $\Delta 1366$ sigue manteniendo la banda correspondiente a los ácidos epoxi micólicos sin que se produzca ningún compuesto nuevo. Este patrón diferencial, se revierte en las muestras recogidas durante la fase estacionaria de crecimiento así como en el segundo cultivo, donde las condiciones de aeración vuelven a la normalidad y donde por tanto se vuelven a observar para ambas cepas los 3 tipos de ácidos micólicos característicos (Figura 25 B).

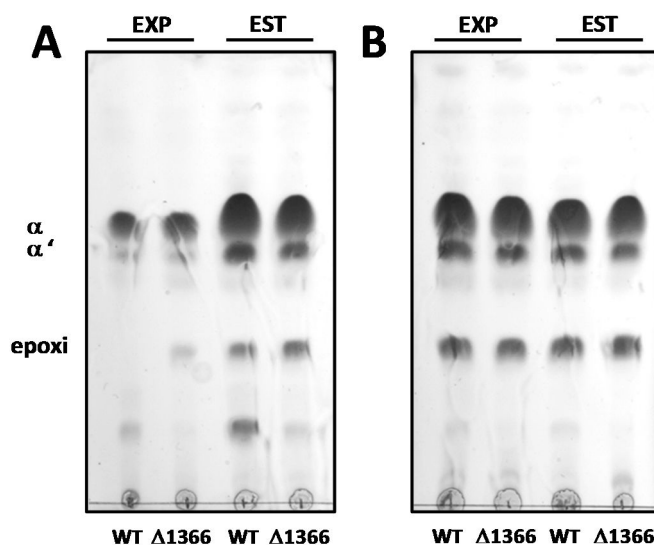


Figura 25. Análisis de la composición en MAMEs (*Mycolic Acid Methyl Esters*) tanto de la cepa silvestre como de la cepa mutante $\Delta 1366$ en medio mínimo con glicerol 18 mM tras inducir la respuesta estricta por microaerofilia. Se muestran los resultados obtenidos tanto en fase exponencial como en fase estacionaria en el primer cultivo (A) y el segundo cultivo (B) tras la inducción de la respuesta estricta.

Para verificar la posible implicación de los operones *mce* con este tipo de situaciones de estrés, se repitió el experimento anterior esta vez induciendo la respuesta estricta mediante la adición de D,L-norvalina (ver apartado 10 de materiales y métodos), un análogo estructural de la Valina que se sabe es capaz de aumentar los niveles de (p)ppGpp en *M. smegmatis* (Dahl *et al.*, 2004). Tras analizar los ácidos micólicos extraídos en estas condiciones observamos que se repetía el patrón obtenido con las condiciones de microaerofilia. En la cepa silvestre se observa que la banda correspondiente a los ácidos epoxi-micólicos disminuye notablemente de intensidad apareciendo de nuevo la banda de menor Rf. En las mismas condiciones, la cepa *M. smegmatis* $\Delta 1366$ mantiene la banda correspondiente a los ácidos epoxi micólicos mientras que la banda desconocida de menor Rf se observa de manera muy tenue (Figura 26).

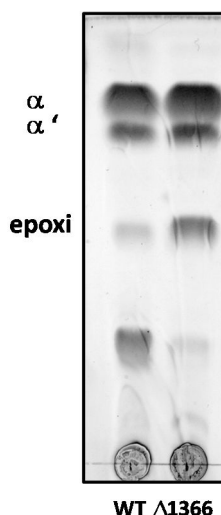


Figura 26. Análisis de la composición en MAMEs (*Mycolic Acid Methyl Esters*) tanto de la cepa silvestre como de la cepa mutante $\Delta 1366$ en medio mínimo con glicerol 18 mM tras inducir la respuesta estricta por D,L-norvalina. Se muestran los resultados obtenidos en el primer cultivo (A) y el segundo cultivo (B) tras la inducción de la respuesta estricta.

1.6. Análisis de la estructura de membrana del mutante *M. smegmatis* $\Delta 1366$ mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

A la vista de los cambios fenotípicos observados en la cepa mutante tanto en medio líquido como en medio sólido, se examinaron de manera directa tanto la morfología como la ultra estructura de la pared celular de la cepa silvestre y del mutante *M. smegmatis* $\Delta 1366$ por microscopía electrónica de trasmisión. En las imágenes obtenidas, se puede observar que aunque ambas cepas presentan un citoplasma y una membrana plasmática similar, se encuentran diferencias a nivel de la envoltura celular entre el mutante y la cepa silvestre. Como puede verse en la Figura 27, en la cepa mutante la zona transparente a electrones situada por fuera de la membrana plasmática muestra una estructura diferente y un grosor disminuido con respecto al presente en la muestra control. Esta zona constituye el dominio hidrofóbico de la pared celular y se ha descrito por numerosos autores está constituido principalmente por ácidos micólicos unidos de manera covalente al arabinogalactano (Liu *et al.*, 1999; Brennan y Nikaido, H., 1995; Paul y Beveridge, 1992).

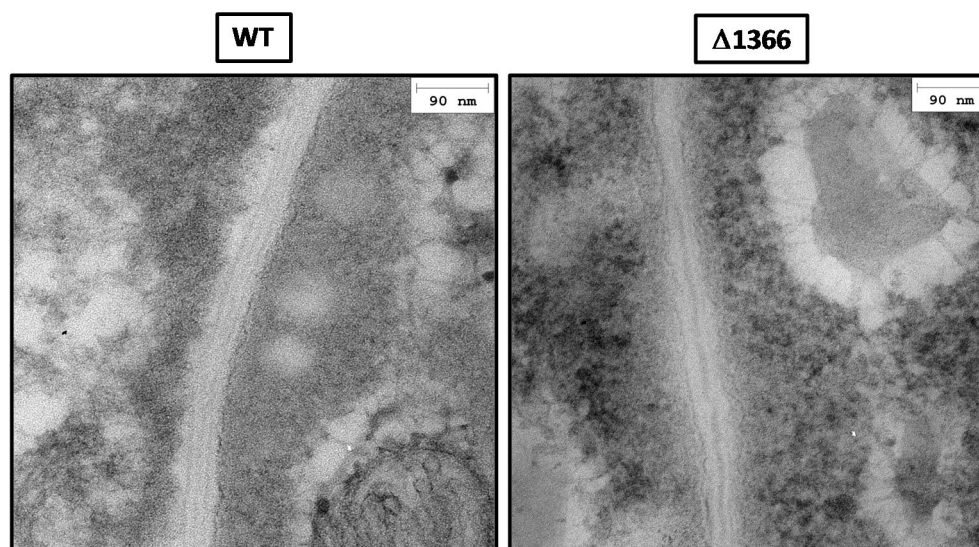


Figura 27. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (MET) de la estructura de la pared celular de las cepas *M. smegmatis* y *M. smegmatis* $\Delta 1366$.

1.7. Estudios de localización celular de los operones *mce* mediante técnicas de fluorescencia.

La posible implicación de los operones *mce* en procesos relacionados con modificaciones de los componentes de la pared celular, sugería que estos complejos podrían estar localizados en regiones específicas de la membrana en las que fueran necesarias dichas modificaciones. Sin embargo, se desconocía hasta el momento si estos operones se encontraban a lo largo de toda la membrana bacteriana o si por el contrario, se localizaban en puntos concretos de la misma.

Con el propósito de estudiar la localización de la ATPasa *MSMEG_1366* en la célula y por tanto y de manera indirecta, la localización de los diferentes operones *mce* en *M. smegmatis* mc²155, el gen *MSMEG_1366* se clonó en el plásmido pDE43-MEK bajo la expresión de un promotor constitutivo en micobacterias. Este plásmido contiene la proteína fluorescente Venus, de tal manera que tras el clonaje quedó fusionada al extremo N-terminal de la ATPasa para permitir su visualización por microscopía de fluorescencia. La construcción así obtenida se electroporó posteriormente en la cepa *M. smegmatis* $\Delta 1366$ y tras verificar la presencia de plásmido, la cepa se cultivó en medio líquido 7H9 hasta una densidad óptica de entre 0.6-0.8. En ese momento se recogió una alícuota del cultivo y se visualizó en el microscopio de fluorescencia en un rango de longitudes de onda de entre 515 y 528 nm.

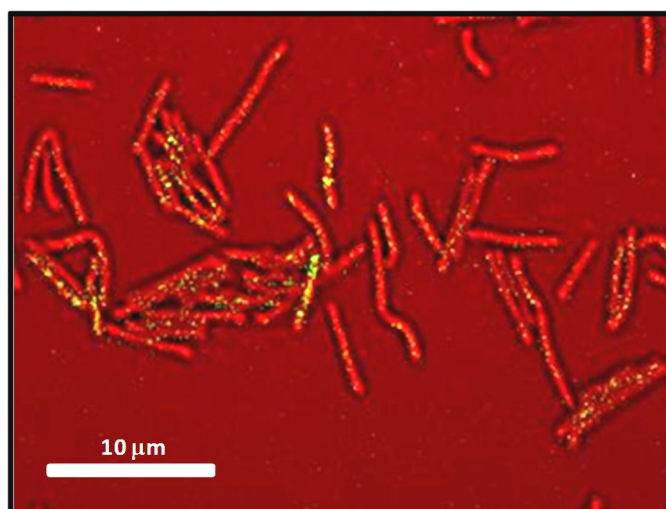


Figura 28. Localización de la ATPasa MceG mediante microscopía de fluorescencia en *M. smegmatis* mc²155. Las imágenes fueron obtenidas de un cultivo en fase exponencial temprana.

Los resultados mostrados en la Figura 28 indican que la ATPasa se localiza específicamente en la membrana de la bacteria de manera irregular a lo largo de la misma. Aunque la fluorescencia observada parece localizarse de manera aleatoria, en las bacterias que muestran más intensidad de señal se puede observar que dicha fluorescencia tiende a concentrarse en puntos específicos y no de manera uniforme, sugiriendo por tanto que los operones *mce* podrían estar localizados en regiones estratégicas de la membrana.

1.8. Análisis de la región C-terminal de la ATPasa MceG

El análisis bioinformático mostró, como ya se ha comentado anteriormente, que el gen *mceG* posee en su región N-terminal todos los dominios típicos asociados a las ATPasas de transportadores de tipo ABC. Sin embargo, la región C-terminal de la ATPasa (aminoácidos 250-360) parece no estar tan conservada y no se encuentran apenas regiones homólogas en las bases de datos (Figura 29). Esta región C-terminal, no posee de hecho ningún dominio esencial para el correcto funcionamiento de una ATPasa ABC por lo que su relevancia y posible función dentro de la proteína MceG son hasta el momento desconocidas. Además, conocíamos de antemano que la proteína marcada en su extremo C-terminal no es funcional, ya que no era capaz de complementar un mutante $\Delta mceG$ en *M. tuberculosis* (CM. Sassetti, comunicación personal). Partiendo de estos antecedentes y con el objetivo de intentar determinar si esta región podría ejercer alguna función específica en el proceso de transporte de colesterol en *M. smegmatis*, se procedió a un estudio de la misma a través de la creación de diferentes versiones truncadas.

ATPasa (WT)

Walker A

MGVQIDVTGLSKSFGSSKIWEDVTMSIPAGEVSVLLGPSGTGKSVFLKSLIGLLRPERG

SIVIDGTDILQCSAKELYEIRTLFGVLFQDGALFGSMNIYDNTAFPLREHTKKSESEIR

Signature Walker B D-loop

KIVMEKLDLVGMPNDGHKFPGEISGGMRKRAGLARALVLDPEIILCDEPD SGLDPVRTA

Switch

YLSQLLIDINAQIDATVLIIVTHNINIARTVPDNMGMLFRKQLVMFGPREVLLTSEEPVV

KQFLNGRRIGPIGMSEEKDEATAAAEQALVDAGQHDGGVEEIEGVPPQLQATPGMPERK

AVARRKARVREILHTLPPAAQAAILEELDRDQPQLSAPTTQTAATAPVENYDDSP TGVIEV

PKQA

ATPasa322

MGVQIDVTGLSKSFGSSKIWEDVTMSIPAGEVSVLLGPSGTGKSVFLKSLIGLLRPERG

SIVIDGTDILQCSAKELYEIRTLFGVLFQDGALFGSMNIYDNTAFPLREHTKKSESEIR

KIVMEKLDLVGMPNDGHKFPGEISGGMRKRAGLARALVLDPEIILCDEPD SGLDPVRTA

YLSQLLIDINAQIDATVLIIVTHNINIARTVPDNMGMLFRKQLVMFGPREVLLTSEEPVV

KQFLNGRRIGPIGMSEEKDEATAAAEQALVDAGQHDGGVEEIEGVPPQLQATPGMPERK

AVARRKARVREILHTLPPAAQAAILEE

ATPasa292

MGVQIDVTGLSKSFGSSKIWEDVTMSIPAGEVSVLLGPSGTGKSVFLKSLIGLLRPERG

SIVIDGTDILQCSAKELYEIRTLFGVLFQDGALFGSMNIYDNTAFPLREHTKKSESEIR

KIVMEKLDLVGMPNDGHKFPGEISGGMRKRAGLARALVLDPEIILCDEPD SGLDPVRTA

YLSQLLIDINAQIDATVLIIVTHNINIARTVPDNMGMLFRKQLVMFGPREVLLTSEEPVV

KQFLNGRRIGPIGMSEEKDEATAAAEQALVDAGQHDGGVEEIEGVPPQLQATPGMP

ATPasa258

MGVQIDVTGLSKSFGSSKIWEDVTMSIPAGEVSVLLGPSGTGKSVFLKSLIGLLRPERG

SIVIDGTDILQCSAKELYEIRTLFGVLFQDGALFGSMNIYDNTAFPLREHTKKSESEIR

KIVMEKLDLVGMPNDGHKFPGEISGGMRKRAGLARALVLDPEIILCDEPD SGLDPVRTA

YLSQLLIDINAQIDATVLIIVTHNINIARTVPDNMGMLFRKQLVMFGPREVLLTSEEPVV

KQFLNGRRIGPIGMSEEKDEAT

Figura 29. Secuencia de aminoácidos de la ATPasa MceG de *M. smegmatis* mc²155 y las diferentes versiones truncadas en la región C-terminal construidas mediante el sistema de clonación Gateway. El número presente en el nombre indica la longitud en aminoácidos de cada versión; se marca sombreado en morado la región determinada como cola C-terminal en los posteriores estudios.

Mediante el sistema de clonación Gateway Multisite (ver apartado 4.8 de materiales y métodos), se generaron tres mutantes truncados en diferentes posiciones de la región C-terminal de la ATPasa a los que se añadieron diversos marcajes en el extremo N-terminal con el objetivo de poder realizar estudios a nivel de expresión y de localización. De esta forma se realizaron tres construcciones truncadas: ATPasa258, ATPasa292 y ATPasa322, donde el número indica la longitud en aminoácidos de los diferentes mutantes de la proteína (Figura 30). Todas estas construcciones junto con la que contenía la versión nativa de la proteína, se clonaron en el plásmido de expresión pDE43-MEK bajo un promotor de expresión constitutivo en micobacterias y posteriormente se electroporaron en el mutante *M. smegmatis* $\Delta 1366$ para poder estudiar el efecto de las modificaciones de la región C-terminal de la ATPasa MceG.

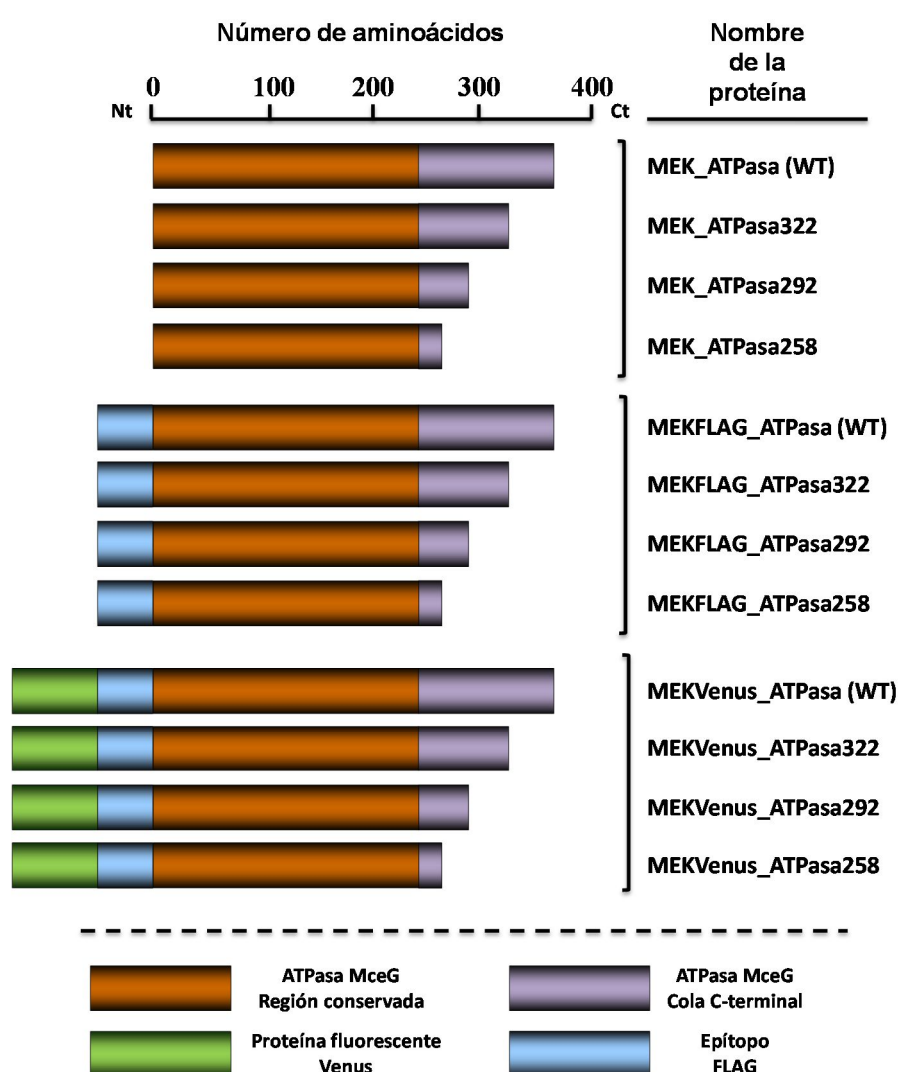


Figura 30. Representación esquemática de las construcciones de las diferentes versiones truncadas de la ATPasa MceG. El número presente en el nombre indica la longitud en aminoácidos de cada versión. Se indican en la leyenda los diversos marcajes añadidos en las diferentes versiones de la ATPasa MceG.

1.8.1. Estudios de crecimiento en colesterol de las versiones truncadas de la ATPasa MceG

Como ya se ha comentado hasta ahora, el gen *MSMEG_1366* codifica una ATPasa que energiza la totalidad de los sistemas Mce que estén presentes en la misma célula. Debido a que el colesterol y esteroides con estructura similar (aquellos que poseen cadena lateral) son los únicos sustratos descritos de este tipo de transportadores hasta el momento, se procedió a estudiar la necesidad de la región C-terminal en el proceso de transporte del colesterol. Para ello, se determinó la capacidad de los diferentes mutantes truncados para complementar la cepa $\Delta 1366$ mediante la realización de curvas de crecimiento en medio mínimo con colesterol 1.8 mM como única fuente de carbono y energía.

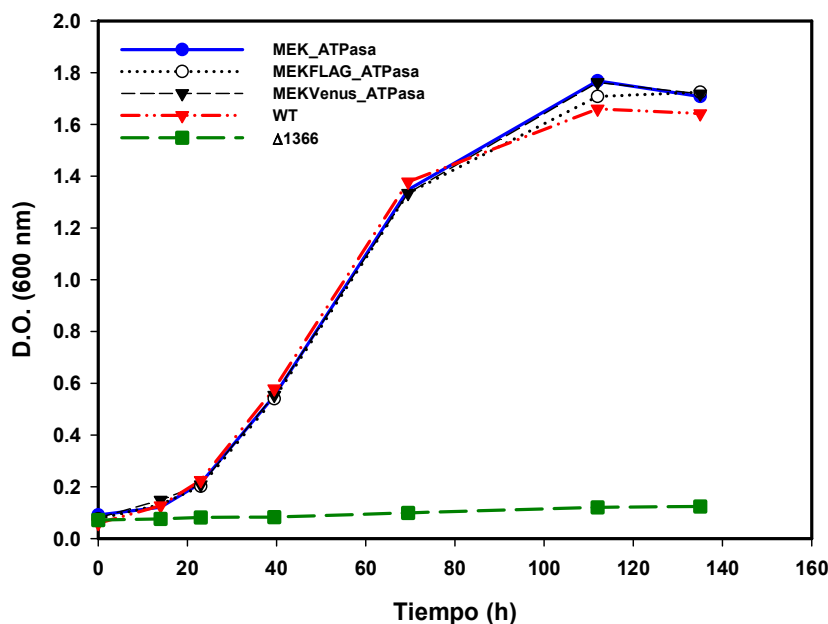


Figura 31. Curvas de crecimiento de la cepa *M. smegmatis* $\Delta 1366$ complementada con la construcción MEK_ATPasa (versión nativa) con diferentes marcajes en el extremo N-terminal. Los cultivos se realizaron en medio mínimo con colesterol 1.8 mM como única fuente de carbono y energía.

Como puede observarse en la Figura 31, todas las cepas que contienen la construcción con la versión nativa de la ATPasa complementan el mutante $\Delta 1366$ y muestran un crecimiento normal en colesterol, demostrando que la presencia de diferentes marcajes en el extremo N-terminal de la proteína no altera el normal funcionamiento de la misma. Al observar estos resultados, se decidió continuar trabajando únicamente con las construcciones MEKVenus de la proteína, que contienen tanto el marcaje fluorescente como el epítipo FLAG y que por tanto podían ser usadas en diversos estudios.

Al contrario de lo que se observó con la versión nativa de la ATPasa, las construcciones que contenían las diferentes versiones truncadas de la misma mostraron un fenotipo distintivo de crecimiento en colesterol (Figura 32). La versión truncada MEK_ATPasa322, complementó el mutante sin mostrar ninguna diferencia de crecimiento con respecto a la cepa silvestre. La versión truncada MEK_ATPasa292 sin embargo, mostró una fase de latencia de aproximadamente 96 h en las condiciones probadas, momento en el cual comenzó a crecer en colesterol con menor tasa de duplicación que la versión nativa pero alcanzando finalmente la misma D.O. Por último la versión truncada MEK_ATPasa258 presentó una fase de latencia aún mayor, comenzando a crecer aproximadamente a las 140 h de cultivo y también con menor tasa de duplicación que la versión nativa. Estos resultados, muestran que el efecto fenotípico observado es directamente proporcional al tamaño de la región C-terminal deletionada y sugieren que esta región de la proteína juega un papel importante en la funcionalidad de la ATPasa para el crecimiento normal en colesterol.

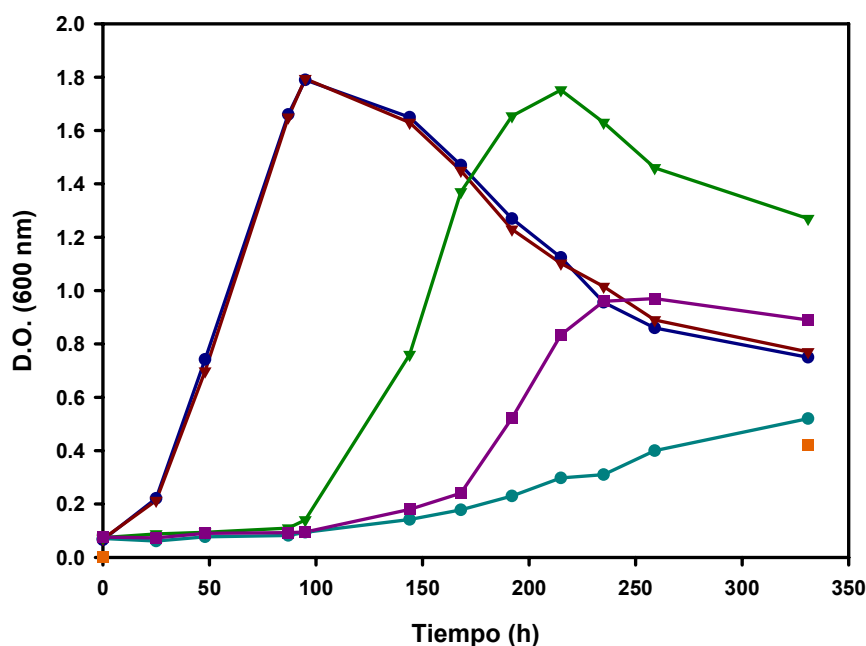


Figura 32. Curvas de crecimiento de la cepa *M. smegmatis* Δ 1366 (línea azul claro) y las cepas *M. smegmatis* Δ 1366 complementadas con las diferentes versiones truncadas de la ATPasa: MEK_ATPasa (WT) (línea azul oscuro); MEK_ATPasa322 (líneas granate); MEK_ATPasa292 (línea verde); MEK_ATPasa258 (línea morada). Los cultivos se realizaron en medio mínimo con colesterol 1.8 mM como única fuente de carbono y energía. Se marca con un punto naranja la D.O. a tiempo final correspondiente al control de medio sin inocular. Los valores representados corresponden a la media de tres réplicas biológicas independientes.

1.8.2. Estudios de expresión de las versiones truncadas de la ATPasa MceG mediante *Western blot*

Los resultados mostrados anteriormente sugieren la necesidad de la presencia de la región C-terminal de la ATPasa en el crecimiento normal en medio mínimo con colesterol. Para profundizar en el estudio de esta región y determinar su posible relevancia desde un punto de vista estructural, se procedió a analizar la expresión de las proteínas a nivel traduccional en las diferentes construcciones creadas.

De esta forma, la expresión endógena de las proteínas ATPasa360, ATPasa322, ATPasa292 y ATPasa258 fue analizada mediante experimentos de *Western blot* empleando anticuerpos monoclonales frente al epítipo FLAG presente en todas las construcciones. Para ello, las diferentes cepas se cultivaron en medio 7H9 hasta alcanzar una fase exponencial de crecimiento, momento en el cual las células se recogieron por centrifugación y posteriormente fueron sonificadas para obtener los extractos proteicos correspondientes. Los extractos proteicos totales así obtenidos se analizaron mediante PAGE-SDS y tras verificar la igualdad en la concentración de las diferentes muestras, se realizó un *Western blot* tal y como se especifica en el apartado 6.4 de materiales y métodos.

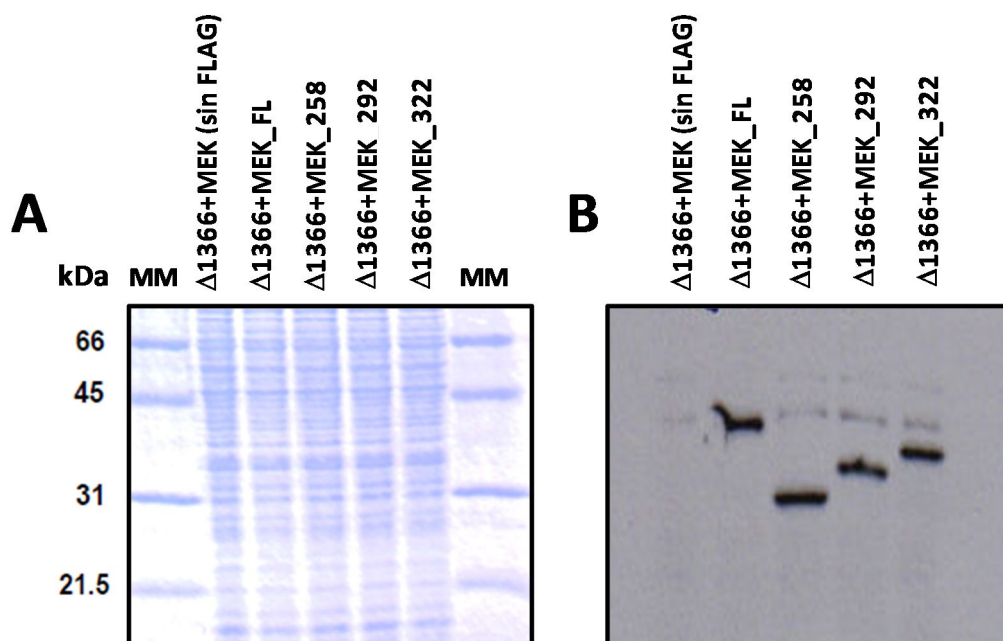


Figura 33. Análisis mediante *Western blot* de la expresión de las diferentes versiones de la ATPasa MceG en la cepa *M. smegmatis* Δ1366. (A) Análisis mediante PAGE-SDS de los extractos proteicos totales de la cepa mutante complementada con diferentes versiones truncadas de la ATPasa MceG. MM: marcadores de masa molecular. (B) Análisis mediante *Western blot* de la ATPasa MceG en las diferentes cepas de *M. smegmatis* Δ1366 usando el anticuerpo anti-FLAG.

Como se observa en la Figura 33, mientras que el control con el plásmido de expresión sin epítipo FLAG da lugar únicamente a un patrón de bandas que consideramos inespecíficas, las diferentes versiones truncadas de la ATPasa marcadas con el epítipo FLAG se expresan y detectan a niveles similares en las condiciones ensayadas. Teniendo en cuenta estos resultados, se puede deducir que la región C-terminal no es necesaria para la estabilización estructural de la ATPasa y que no existen diferencias significativas en la expresión de las proteínas que expliquen la falta de complementación del mutante $\Delta 1366$ en colesterol.

1.8.3. Comparación de la localización celular de la ATPasa nativa con respecto a las versiones truncadas mediante técnicas de fluorescencia

Tras los resultados obtenidos con las versiones truncadas de la ATPasa de complementación y expresión, se decidió comparar la localización celular de la versión nativa con respecto a una versión truncada para verificar si la región C-terminal de esta proteína podría estar implicada en la correcta unión de la ATPasa al componente permeasa del transportador. Para realizar el experimento, la cepa con la versión nativa de la ATPasa junto con la que contenía la versión truncada ATPasa258 se cultivaron en medio líquido 7H9 hasta una D.O. aproximada de 0.6-0.8, momento en el cual se recogieron alícuotas para observar la fluorescencia y localización de la ATPasa MceG en ambas cepas.

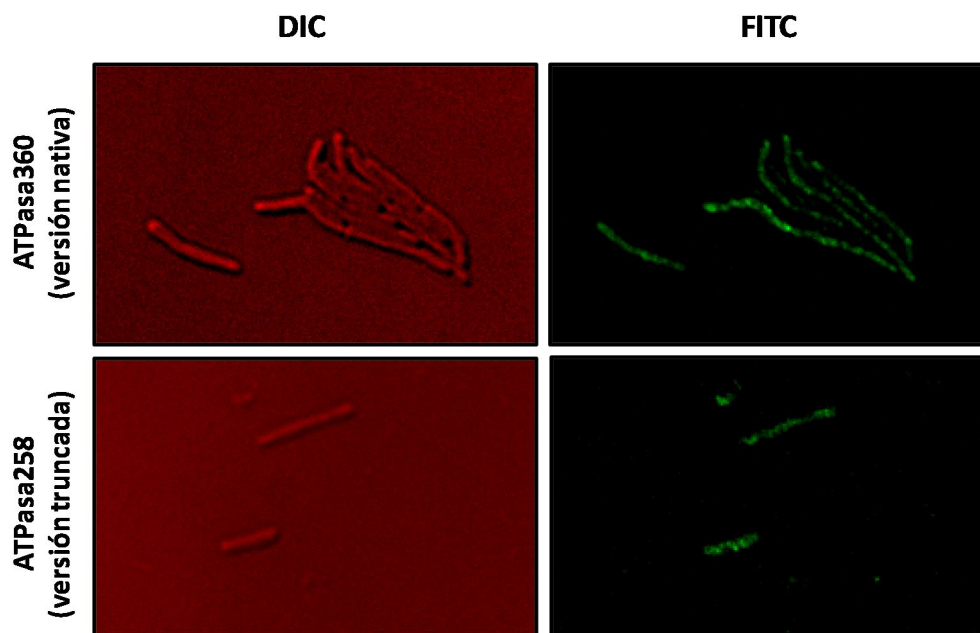


Figura 34. Visualización mediante microscopía de fluorescencia de la localización de la ATPasa (versión nativa) y la ATPasa258 (versión truncada) en la cepa *M. smegmatis* $\Delta 1366$. DIC: Contraste interferencial; FITC: Fluorescencia medida en un rango de 515 nm a 528 nm.

Como puede verse en la Figura 34, se vuelve a repetir el patrón de fluorescencia observado para la versión nativa de la ATPasa, es decir, una localización en membrana que parece concentrarse en sitios específicos de la misma (ver apartado 4 de este mismo capítulo de resultados). En el caso de la versión truncada ATPasa258 y aunque esta no sea capaz de complementar el mutante $\Delta 1366$ en crecimiento en colesterol, la localización parece no verse afectada y presenta un patrón de fluorescencia similar al visto en la ATPasa nativa. Es importante destacar que aunque puede observarse que la ATPasa truncada 258 se encuentra unida a membrana, no se puede asegurar a través de estos estudios si se encuentra unida a la totalidad de los operones *mce* o no.

2. Estudio del operón *mce4* y su implicación en el transporte activo de colesterol en *M. smegmatis* mc²155

2.1. Estudio *in silico* del operón *mce4* implicado en el transporte activo de colesterol en *M. smegmatis* mc²155.

Los operones *mce* poseen una organización característica diferente a los sistemas ABC descritos hasta el momento cuyo estudio ha sido abordado principalmente a nivel bioinformático (Casali *et al.*, 2007). Gracias a este análisis *in silico*, se propusieron los dominios consenso presentes en los diferentes genes de los operones *mce* que han sido usados en esta Tesis Doctoral para realizar una búsqueda de los mismos en *M. smegmatis*. Como se ha comentado en la Introducción, *M. smegmatis* mc²155 posee seis operones *mce* que han sido denominados *mce1*, *mce3*, *mce4*, *mce5*, *mce5bis* y *mce7* sobre la base de su comparación bioinformática con los operones *mce* presentes en diferentes Actinobacterias. Mientras que el operón *mce4* es el único cuya función ha sido demostrada de manera experimental hasta el momento, se ha postulado que la función del resto de los operones está relacionada con procesos de importación de sustratos de tipo lipídico.

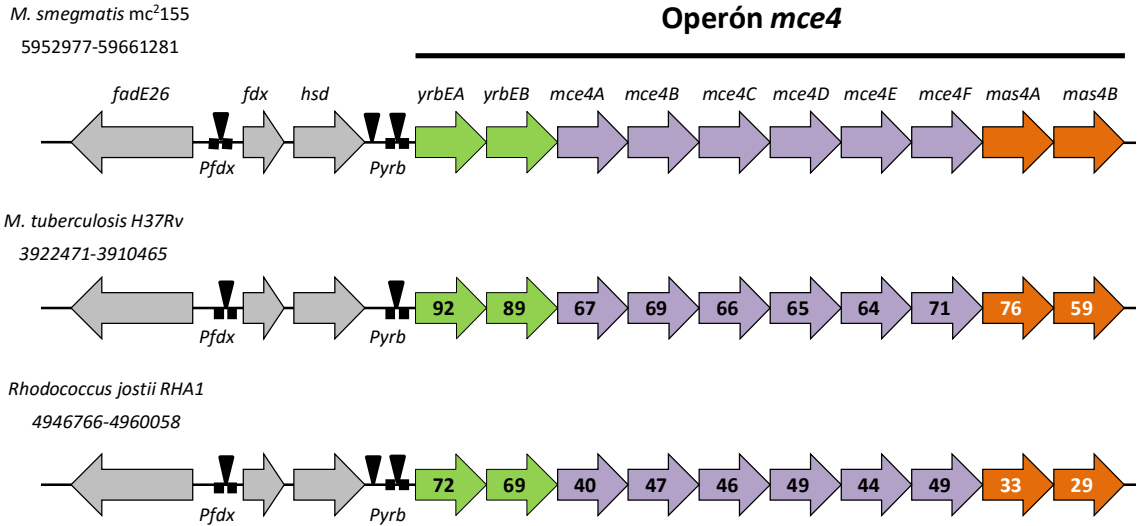
La comparación de secuencias con los operones *mce4* anteriormente descritos en *M. tuberculosis* y *R. jostii* RHA1 a través de un análisis detallado del genoma de *M. smegmatis*, ha permitido la identificación del operón MSMEG_5901-MSMEG_5893 como el candidato más probable para codificar el sistema de transporte de colesterol en esta bacteria (Figura 35 A).

2.1.1. Componentes permeasas YrbE4AB

En primer lugar, se realizaron análisis de comparación de secuencias utilizando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para determinar el grado de similitud de cada gen del operón *mce4* identificado no solo con los genes *mce4* presentes en bacterias relacionadas, sino también con los genes homólogos presentes en el resto de operones *mce* del propio *M. smegmatis*.

De esta forma, se observó que las secuencias de aminoácidos de los genes pertenecientes a los componentes permeasas del operón *mce4* (MSMEG_5902-MSMEG_5901), presentan una identidad superior al 63% con respecto a sus homólogos en las diferentes Actinobacterias estudiadas excepto en el caso de *Streptomyces coelicolor*, donde el porcentaje de identidad baja hasta un 47%. Además, también son los genes más conservados entre los diferentes operones presentes en *M. smegmatis* con un porcentaje de identidad que supera el 54% en todos los casos excepto para el denominado operón *mce7* con el que solo se observa una identidad del 37% (Tabla 7).

A.



B.

Secuencia consenso	tnnaacnngtttnna
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	ta ga aacac g tttca
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 (-10)	<u>gc</u> ga aa ctt g ttcta
<i>R. jostii</i> RHA1	tcgaacg_ g ttcga
<i>R. jostii</i> RHA1 (-10)	<u>gt</u> ga aa ac g ttcta
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<u>gc</u> a aa ctc g ttct <u>g</u>

Figura 35. A. Representación esquemática de las regiones génicas donde se encuentran localizados los genes que codifican el operón *mce4* de *M. smegmatis* mc²155, *M. tuberculosis* H37Rv y *R. jostii* RHA1. Se indica el porcentaje de identidad en aminoácidos de cada uno de los genes con respecto a los de *M. smegmatis* mc²155. Los triángulos localizados en la zona *P_{yrb}* representan secuencias operadoras para el regulador KstR y los cuadrados indican cajas -10 y -35. B. Secuencias correspondientes a la caja operadora del represor KstR presentes en la región promotora *Mce4* (*P_{yrb}*) de *M. smegmatis* mc²155 (dos secuencias presentes), *M. tuberculosis* H37Rv (una secuencia presente) y *R. jostii* RHA1 (dos secuencias presentes). Se indican en negrita las bases coincidentes con la secuencia consenso mientras que las bases diferentes aparecen subrayadas.

A.

MSMEG_5902 (yrbE4A)	% identidad	Long. en aa
<i>M. smegmatis</i>	100	254
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	92 (98%)	254
<i>M. bovis</i>	92 (98%)	254
<i>M. leprae</i>	63 (97%)	267
<i>N. farcinica</i>	74 (100%)	254
<i>S. coelicolor</i>	47 (95%)	254
<i>R. jostii</i> RHA1	72 (98%)	254
MSMEG_5901 (yrbE4B)	% identidad	Long. en aa
<i>M. smegmatis</i>	100	287
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	89 (97%)	280
<i>M. bovis</i>	89 (97%)	280
<i>M. leprae</i>	52 (91%)	289
<i>N. farcinica</i>	69 (97%)	283
<i>S. coelicolor</i>	49 (90%)	268
<i>R. jostii</i> RHA1	69 (95%)	283

B.

MSMEG_5902 (yrbE4A)	% Identidad	Long. en aa
<i>MSMEG_5902</i>	100	254
<i>MSMEG_4796 (yrbE5A)</i>	72 (98%)	257
<i>MSMEG_2853 (yrb5bA)</i>	70 (96%)	270
<i>MSMEG_0132 (yrbE1A)</i>	64 (97%)	266
<i>MSMEG_0344 (yrbE3A)</i>	65 (96%)	256
<i>MSMEG_1141 (yrbE7A)</i>	37 (91%)	289
MSMEG_5901 (yrbE4B)	% Identidad	Long. en aa
<i>MSMEG_5901</i>	100	287
<i>MSMEG_2854 (yrbE5bB)</i>	66 (94%)	281
<i>MSMEG_4795 (yrbE5B)</i>	67 (95%)	282
<i>MSMEG_0345 (yrbE3B)</i>	56 (94%)	272
<i>MSMEG_0133 (yrbE1B)</i>	54 (91%)	289
<i>MSMEG_1142 (yrbE7B)</i>	37 (91%)	285

Tabla 7. Porcentaje de identidad en aminoácidos de los componentes permeasas del operón *mce4* con sus homólogos en bacterias relacionadas (A) y con los diferentes operones *mce* presentes en el propio *M. smegmatis* mc²155 (B). Se muestra entre paréntesis el porcentaje de cobertura existente en cada análisis.

Como se observa, las permeasas de los operones *mce* presentan gran similitud entre los organismos estudiados y por tanto un alto nivel de conservación evolutiva sin embargo, el análisis más exhaustivo de su secuencia muestra que existen importantes diferencias en dominios esenciales con respecto a las permeasas de los transportadores ABC descritos hasta el momento. Saurin *et al.* (1994), describieron una secuencia de aminoácidos altamente conservada en el bucle

citoplasmático de las permeasas de los importadores ABC que denominaron motivo EAA y que se propuso constituía la zona de interacción con la ATPasa del sistema. El análisis bioinformático de los alineamientos de secuencia de las proteínas YrbE presentes en diferentes Actinobacterias no reveló ningún motivo EAA, pero sí una secuencia conservada en el penúltimo bucle citoplasmático que no parece ser homóloga a ningún motivo anteriormente descrito. Este motivo, que contiene la secuencia EExDA se localizó en las permeasas YrbE de todos los organismos estudiados con operones *mce*, sugiriendo una implicación directa de la secuencia en la función de estos sistemas.



Figura 36. Secuencia consenso denominada motivo EExDA presente en las permeasas YrbE. La secuencia consenso se obtuvo mediante el programa WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu>) a partir de las secuencias de las diferentes bacterias incluidas en la Tabla 7.

2.1.2. Componentes de unión a sustrato (SBPs) Mce4ABCDEF

Los genes *mce4A-mce4F* han sido descritos previamente como proteínas de unión a sustrato a través de análisis bioinformáticos (Casali *et al.*, 2007). Como ya se ha comentado anteriormente, esta clase de proteínas son características de los sistemas de importación ABC ya que reconocen y se unen específicamente al sustrato que se va a transportar por el sistema. Debido a la existencia de varios operones *mce* en el genoma de *M. smegmatis* y teniendo en cuenta el grado de similitud de organización génica que poseen, es posible que estos sistemas posean funciones redundantes pero reguladas por diferentes factores. Esta posibilidad se fundamenta en los estudios realizados por Kumar *et. al* (2003), que observaron diferencias en la expresión transcripcional de los operones *mce1*, *mce3* y *mce4* en *M. tuberculosis* dependiendo de la fase de crecimiento y el tejido infectado.

Para comparar todas las proteínas SBPs presentes en *M. smegmatis* entre sí, se realizó un análisis bioinformático que reveló que las proteínas del sistema Mce4 comparten un porcentaje de identidad de aminoácidos de entre el 23% y el 43% con respecto a las proteínas homólogas inter-operones (por ejemplo, existe un 38% de identidad entre la proteína Mce4A y la Mce5A). Aunque la similitud de las proteínas del operón *mce4* parece ser mayor con alguno de los operones en particular (es el caso del operón descrito como *mce5* en *M. smegmatis*, con el cual los porcentajes de similitud para casi todas las proteínas SBPs rondan el 40%), no se puede afirmar

de manera evidente que existan proteínas homólogas en los diferentes operones y por tanto que puedan tener funciones redundantes reguladas por diferentes factores (Tabla 8 A). El análisis de similitud entre los genes que codifican los componentes anotados como SBPs dentro del operón *mce4* (Mce4A-Mce4F), mostró que estas proteínas presentan únicamente un porcentaje de similitud del 21-26% con respecto al resto de proteínas Mce codificadas en el mismo operón (por ejemplo, 23% de identidad entre la proteína Mce4A y la proteína Mce4B), descartando en principio la posibilidad de que la presencia de un elevado número de SBPs en un mismo sistema de transporte responda a una redundancia funcional (Tabla 8 B).

La predicción de la estructura secundaria de las proteínas Mce4 realizada mediante el servidor JPred permitió observar la existencia de una estructura consenso de 5 láminas β y 8 hélices α así como una posible hélice transmembrana en la región N-terminal, característica asociada a proteínas que se anclan en membrana. La región C-terminal por el contrario resultó ser más variable en longitud y plegamiento. Ambas observaciones junto con el hecho de que la organización génica formando un operón se encuentra altamente conservada en las Actinobacterias, indican que estas proteínas se asocian para formar un complejo heteromérico anclado a la membrana celular, observación ya planteada por varios autores anteriormente (Casali *et al.*, 2007).

A.

<i>MSMEG_5900 (mce4A)</i>	% Identidad	Long. en aa
<i>MSMEG_5900</i>	100	400
<i>MSMEG_4794 (mce5A)</i>	38 (95%)	424
<i>MSMEG_2855 (mce5bA)</i>	35 (92%)	395
<i>MSMEG_0134 (mce1A)</i>	29 (96%)	409
<i>MSMEG_0346 (mce3A)</i>	32 (80%)	474
<i>MSMEG_1143 (mce7A)</i>	23 (83%)	534
<i>MSMEG_5899 (mce4B)</i>	% Identidad	Long. en aa
<i>MSMEG_5899</i>	100	344
<i>MSMEG_4793 (mce5B)</i>	40 (97%)	341
<i>MSMEG_2856 (mce5bB)</i>	41 (97%)	343
<i>MSMEG_0135 (mce1B)</i>	38 (97%)	343
<i>MSMEG_0347 (mce3B)</i>	36 (96%)	342
<i>MSMEG_1144 (mce7B)</i>	29 (72%)	351
<i>MSMEG_5898 (mce4C)</i>	% Identidad	Long. en aa
<i>MSMEG_5898</i>	100	352
<i>MSMEG_4792 (mce5C)</i>	38 (40%)	158
<i>MSMEG_2857 (mce5bC)</i>	43 (78%)	358
<i>MSMEG_0136 (mce1C)</i>	34 (92%)	524
<i>MSMEG_0348 (mce3C)</i>	41 (91%)	442
<i>MSMEG_1145 (mce7C)</i>	29	346
<i>MSMEG_5897 (mce4D)</i>	% Identidad	Long. en aa
<i>MSMEG_5897</i>	100	454
<i>MSMEG_4787 (mce5D)</i>	43 (76%)	486
<i>MSMEG_2858 (mce5bD)</i>	40 (96%)	485
<i>MSMEG_0137 (mce1D)</i>	35 (83%)	547
<i>MSMEG_0349 (mce3D)</i>	39 (72%)	433
<i>MSMEG_1146 (mce7D)</i>	34 (62%)	373
<i>MSMEG_5896 (mce4E)</i>	% Identidad	Long. en aa
<i>MSMEG_5896</i>	100	382
<i>MSMEG_4786 (mce5E)</i>	39 (91%)	466
<i>MSMEG_2859 (mce5bE)</i>	40 (86%)	396
<i>MSMEG_0138 (mce1E)</i>	30 (86%)	390
<i>MSMEG_0350 (mce3E)</i>	39 (86%)	379
<i>MSMEG_1147 (mce7E)</i>	24	426
<i>MSMEG_5895 (mce4F)</i>	% Identidad	Long. en aa
<i>MSMEG_5895</i>	100	564
<i>MSMEG_4785 (mce5F)</i>	36 (98%)	576
<i>MSMEG_2860 (mce5bF)</i>	43 (73%)	495
<i>MSMEG_0139 (mce1F)</i>	37 (76%)	518
<i>MSMEG_0351 (mce3F)</i>	38 (77%)	495
<i>MSMEG_1148 (mce7F)</i>	26	418

B.

	Long. en aa	Mce4A	Mce4B	Mce4C	Mce4D	Mce4E	Mce4F
Mce4A	400	100	-	-	-	-	-
Mce4B	344	23 (47%)	100	-	-	-	-
Mce4C	352	26 (47%)	22 (93%)	100	-	-	-
Mce4D	454	22 (65%)	23 (78%)	23 (69%)	100	-	-
Mce4E	382	25 (60%)	20 (80%)	25 (31%)	21 (65%)	100	-
Mce4F	564	21 (61%)	24 (74%)	22 (87%)	23 (74%)	24 (77%)	100

Tabla 8. A. Porcentaje de identidad en aminoácidos de los componentes SBPs del operón *mce4* con respecto a los diferentes operones *mce* presentes en el propio *M. smegmatis* mc²155. B. Porcentaje de identidad en aminoácidos entre los diferentes genes SBPs del operón *mce4*. Se muestra entre paréntesis el porcentaje cobertura existente en cada análisis.

2.1.3. Proteínas Mas (Mce associated proteins) Mas4AB

El último conjunto de genes dentro del operón *mce4* en *M. smegmatis* está constituido por una pareja de genes que codifican las denominadas proteínas Mas4AB (*MSMEG_5894-MSMEG_5893*) (Figura 35 A). Esta pareja de genes son de función desconocida ya que no existen homólogos en otros transportadores de tipo ABC descritos hasta el momento. El análisis *in silico* reveló que a diferencia de otras proteínas presentes en los operones *mce*, éstas no se encuentran conservadas entre los diferentes organismos estudiados, de hecho, las proteínas Mas no se encuentran en todos los operones *mce* pero cabe destacar que cuando están presentes siempre lo hacen en parejas o números pares. Como ya se ha comentado en la Introducción, esta particularidad ha hecho postular que este conjunto de genes podrían formar heterodímeros jugando un papel accesorio en la unión del sustrato que se va a transportar.

Los únicos operones *mce4* funcionalmente descritos hasta el momento (*M. tuberculosis* y *R. jostii* RHAI) poseen dos genes codificantes de las denominadas proteínas Mas. Aunque la necesidad de esta pareja de genes en el transporte de colesterol en *R. jostii* RHAI ha sido demostrada experimentalmente, su función exacta dentro del operón *mce4* así como su necesidad en cada uno de los operones *mce* son aún desconocidas. El análisis de comparación de secuencia de las proteínas Mas de *M. smegmatis* con las de estos dos organismos, mostró un mayor porcentaje de identidad con las proteínas de *M. tuberculosis* que con las de *R. jostii* RHAI (Tabla 9). Cabe destacar también que este porcentaje difiere entre ambos genes siendo significativamente mayor en el caso del gen *MSMEG_5894* (Mas4A) que con el gen *MSMEG_5893* (Mas4B), lo que podría sugerir que esta pareja de genes no ha evolucionado de la misma manera.

<i>MSMEG_5894</i>	% Identidad	% Positivos
<i>Rv3493c</i>	76 (68%)	84 (68%)
<i>RHA1_ro04704</i>	33 (65%)	52 (65%)
<i>MSMEG_5893</i>	% Identidad	% Positivos
<i>Rv3492c</i>	59 (98%)	77 (98%)
<i>RHA1_ro04705</i>	29 (85%)	50 (85%)

Tabla 9. Porcentaje de identidad en aminoácidos de las proteínas Mas del operón *mce4* con sus homólogos en *M. tuberculosis* y *R. jostii* RHAI. Se muestra entre paréntesis el porcentaje cobertura existente en cada análisis.

2.1.4. Análisis de la interacción proteica de los genes del operón *mce4* en *M. smegmatis* mediante análisis de tipo bioinformático.

Teniendo en cuenta que las proteínas del operón *mce4* probablemente formen un complejo proteico, se decidió confirmar la asociación de las proteínas entre sí así como analizar las posibles interacciones de este sistema con proteínas adicionales al mismo. Para ello y sabiendo

que los genes de las permeasas son los más conservados, se realizó un análisis de la interacción proteica del gen *MSMEG_5901* (YrbE4B) mediante el sistema bioinformático STRING. Usando un análisis de confianza de 0.7, se puede observar en la Figura 37 que la mayoría de interacciones observadas corresponden con las proteínas de unión a sustrato del operón *mce4* (*MSMEG_5900-MSMEG_5895*) aunque el tipo de interacciones descritas corresponden únicamente a procesos de co-existencia (la presencia de la proteína YrbE4B junto con el resto de proteínas indicadas en la red de interacción se repite en gran parte de los genomas secuenciados).

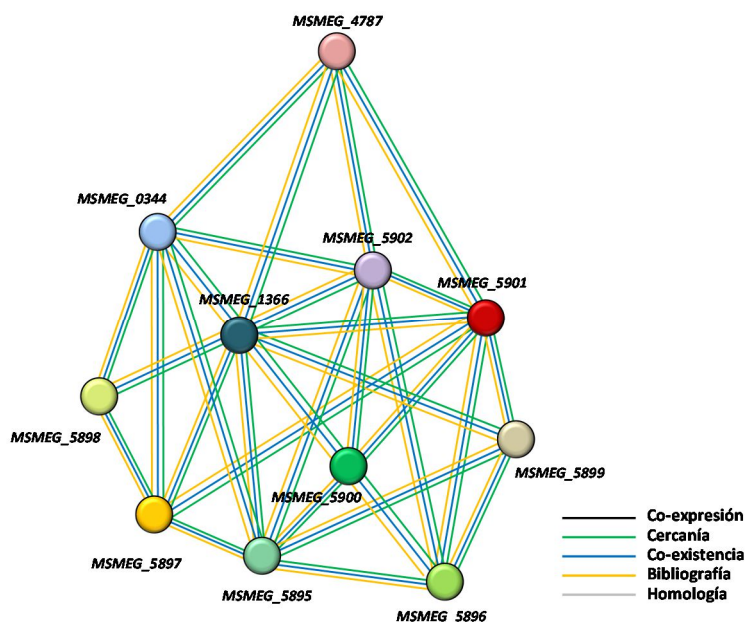


Figura 37. Representación gráfica de la red de interacción de la proteína *MSMEG_5901* (denominadas según la abreviatura del gen), utilizando el programa STRING. Los nodos del gráfico representan las proteínas, mientras que los enlaces que unen los distintos nodos indican las relaciones existentes entre ellas, indicadas en la leyenda. Se omitieron los nodos que no presentaban ninguna conexión. El conjunto de datos se limita al organismo *M. smegmatis*. El valor de confianza aplicado fue 0.7 (confianza alta).

Se observan también interacciones con proteínas no presentes en el operón *mce4*, en primer lugar, el gen *MSMEG_1366*, ATPasa del sistema, cuyo estudio ya se ha realizado previamente en esta Tesis Doctoral. En segundo lugar también se muestra en el análisis la interacción del gen *MSMEG_5901* con otras dos proteínas no presentes en el operón *mce4*: la proteína *MSMEG_0344*, que codifica la permeasa A del operón *mce3* (YrbE3A) en *M. smegmatis* y la proteína *MSMEG_4787* que codifica la permeasa A del operón denominado *mce5* bis (YrbE5bA) en el mismo organismo. Ambas interacciones se basan en procesos de co-existencia generando valores para la interacción de 0.89 y de 0.86, respectivamente, lo que sugiere que la presencia del operón *mce4* junto con estos dos operones se repite en gran parte de los genomas secuenciados.

Debido al desconocimiento existente sobre la función de las denominadas proteínas Mas, se realizó un análisis de interacción proteica del gen *MSMEG_5893* con el objetivo de intentar obtener mayor información sobre su funcionalidad. Como puede observarse en la Figura 38, la red de interacción proteica del gen *MSMEG_5893* proporcionada por el software con un nivel de confianza de 0.7 es relativamente escasa, mostrando interacciones casi exclusivamente debidas a vecindad.

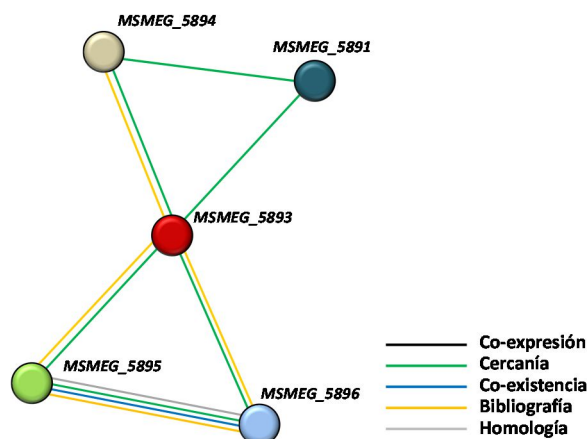


Figura 38. Representación gráfica de la red de interacción de la proteína MSMEG_5893 (denominadas según la abreviatura del gen), utilizando el programa STRING. Los nodos del gráfico representan las proteínas, mientras que los enlaces que unen los distintos nodos indican las relaciones existentes entre ellas, indicadas en la leyenda. Se omitieron los nodos que no presentaban ninguna conexión. El conjunto de datos se limita al organismo *M. smegmatis*. El valor de confianza aplicado fue 0.7 (confianza alta).

2.2. Análisis de la expresión génica del gen *MSMEG_5899* (*mce4B*) mediante qRT-PCR

Kendall *et al.* (2007) propusieron que el operón *mce4* pertenecía al regulón KstR basándose en dos premisas. En primer lugar, el análisis *in silico* mostró la presencia de un motivo conservado para KstR en la región 5' del gen *MSMEG_5902* (promotor P_{yrb} , Figura 35 B) y en segundo lugar, los análisis globales de transcriptómica mostraron que el operón *mce4* se encontraba inducido en ausencia del represor KstR (mutante Δ KstR).

Debido a la gran similitud en las secuencias de las permeasas de los diferentes operones *mce* presentes en *M. smegmatis*, se ha investigado la expresión de los genes del operón *mce4* en este organismo a través de la comparación de la abundancia del transcrito del gen *MSMEG_5899* (Mce4B) en células crecidas en medio mínimo con glicerol (medio control) o colesterol (medio de inducción) como única fuente de carbono y energía. Los resultados, mostrados en la Figura 39, indican que pese a la presencia de la secuencia operadora del represor KstR en la región promotora, existen niveles basales de expresión del operón *mce4* en medio mínimo con glicerol.

Sin embargo, como ocurre en el caso del gen *mceG* (ATPasa del sistema), se observa una inducción de algo más de 2 veces en presencia de colesterol.

Como ya se ha comentado anteriormente, Kumar *et al.* (2003) describieron que existía una expresión diferencial de los operones *mce* en *M. tuberculosis* dependiendo del tejido infectado y la fase de crecimiento de la bacteria. De esta forma, determinaron que la expresión del operón *mce4* era mínima en fase exponencial y se inducía en fase estacionaria de crecimiento. Con el objetivo de comprobar una expresión diferencial atendiendo a la fase de crecimiento en el caso de *M. smegmatis* mc²155, se determinó también la expresión del operón *mce4* en fase estacionaria temprana de crecimiento (D.O. de 2.7 en glicerol 18 mM y D.O. de 1.7 en colesterol 1.8 mM). Como puede observarse en la Figura 39, en la fase estacionaria de crecimiento se observan niveles de expresión comparables a los de fase exponencial del operón *mce4* en colesterol con respecto al medio con glicerol (aproximadamente 1.5 veces de inducción), pero no se aprecia la inducción tan significativa observada por Kumar *et al.* (2003) en *M. tuberculosis*.

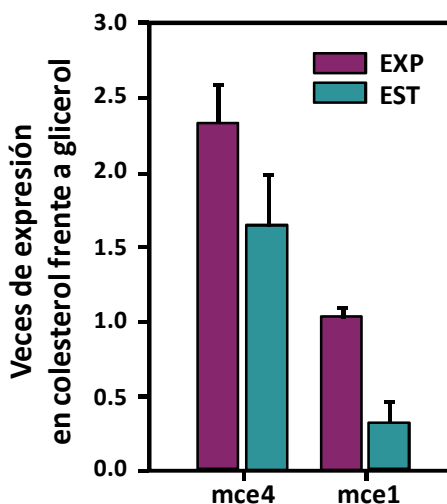


Figura 39. Análisis de la expresión diferencial del operón *mce4* (gen *MSMEG_5899*) y del operón *mce1* (gen *MSMEG_0134*) en la cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155. En la gráfica se representa la expresión de los genes en colesterol con respecto a la expresión de los mismos en glicerol. La expresión de cada uno de los genes es a su vez relativa a la expresión del gen *MSMEG_2758* (*sigA*) empleado como control interno. Los valores corresponden a la media de tres réplicas biológicas independientes.

Por último y para corroborar que el operón *mce4* es el único operón *mce* inducido en presencia de colesterol en *M. smegmatis*, se decidió estudiar también la expresión en estas condiciones de uno de los operones *mce* presentes en la bacteria que no posee sitios de reconocimiento de KstR. Como puede observarse en la Figura 39, los niveles de transcrito del operón *mce1* observados en medio mínimo con colesterol en fase exponencial son casi idénticos a los observados en glicerol (ratio de expresión colesterol/glicerol igual a 1). En la fase estacionaria de crecimiento los niveles en glicerol incluso superan a los observados en colesterol,

descartando una posible implicación de estos genes en el metabolismo del esteroide. Es interesante destacar que la inducción del operón *mceI* coincide con la observado para el gen *MSMEG_1366* (MceG) en fase estacionaria (ver apartado 1.3. del capítulo 1 de Resultados), lo que sugiere que en estas condiciones la producción de la ATPasa MceG podría estar encaminada a responder a los requerimientos funcionales de otro sistema Mce distinto al operón *mce4*.

En el análisis *in silico* realizado cabe destacar que la región operadora KstR del operón *mce4* en *M. smegmatis* descrita por Kendall *et al.* (2007) no se encuentra solapando las cajas -10 y -35 del promotor P_{yrbE} , sino que se localiza a -232 nucleótidos del lugar de iniciación de la traducción del gen *MSMEG_5902* (Figura 35 A). La presencia de un sitio de reconocimiento para KstR tan alejado del inicio del gen sugiere que la regulación transcripcional del operón *mce4* se podría producir a nivel de la elongación de la transcripción llevada a cabo por el promotor P_{fdx} y no en la iniciación, ya que RNA polimerasa podría ser capaz de unirse e iniciar la transcripción en el promotor P_{yrbE} incluso si el represor KstR se encuentra unido a esta región operadora localizada a 232 nucleótidos (Figura 35 A). El promotor P_{fdx} controla la expresión del gen *MSMEG_5903* que codifica una 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Hsd4A) y del gen *MSMEG_5904* que codifica una ferredoxina (FdxD). Ambos genes presentan una elevada inducción en un mutante Δ KstR sugiriendo su implicación en el metabolismo del colesterol, por lo que la transcripción a partir de promotor P_{fdx} podría ser policistrónica en presencia de este esteroide haciendo necesaria la presencia de la secuencia operadora para KstR en la región intergénica de los dos operones.

Un análisis más exhaustivo de la secuencia promotora del operón *mce4* en *M. smegmatis* reveló la presencia de un sitio adicional de unión de KstR no descrito previamente por Kendall *et al.*, (2007) localizado a -134 nucleótidos del inicio de la traducción del gen *MSMEG_5902* y que contiene únicamente una diferencia con respecto a la secuencia consenso (Figura 35 B). Esta segunda secuencia operadora se encuentra situada entre cajas -10 y -35, por lo que la unión del represor KstR a esta zona impediría la unión de la RNA polimerasa y por tanto la iniciación de la transcripción. Este análisis sugiere que la expresión del operón *mce4* en *M. smegmatis* podría poseer dos niveles de control: uno a nivel de la iniciación de la transcripción mediante la unión de KstR en la secuencia identificada en el P_{yrbE} y otro a nivel de la elongación mediante la unión a la secuencia en la región P_{fdx} .

El análisis *in silico* de la región promotora del operón *mce4* de *R. jostii* RHA1 ha permitido identificar además de la región operadora para el KstR solapando con las cajas -10 y -35, una región operadora adicional en este caso a -388 nucleótidos del inicio del gen *yrbE4A*. Dado que en el análisis transcriptómico de los genes del operón *mce4* llevado a cabo en *R. jostii* RHA1 se detectó una inducción de 2 a 3 veces (van der Geize *et al.*, 2007), similar a la observada en este trabajo en *M. smegmatis*, el mecanismo de regulación transcripcional podría ser similar entre ambos organismos. En *M. tuberculosis* por el contrario se identifica una única región operadora para KstR situada entre las cajas -10 y -35 que además presenta menor similitud con la secuencia

consenso, sugiriendo no solo que el represor KstR se uniría a esta región con menor afinidad sino que el mecanismo de regulación del operón *mce4* en esta bacteria podría ser diferente al existente en *M. smegmatis* y *R. jostii*.

2.3. Estudio mutacional del operón *mce4*

El operón *mce4* es el único sistema Mce descrito hasta el momento al que se le ha relacionado directa y experimentalmente con el transporte específico de un sustrato tanto en *M. tuberculosis* (Pandey *et al.*, 2008) como en *R. jostii* RHA1 (Monh *et al.*, 2008). Sin embargo, la gran variabilidad en el número de operones *mce* presente en diferentes Actinobacterias así como la falta de conocimiento sobre la función específica de cada uno de ellos, hace necesario el estudio directo de los diferentes sistemas en cada organismo de manera independiente. Además y como se ha detallado al inicio de este capítulo, la similitud de los diferentes operones *mce* presentes en la misma célula nos predispone a especular sobre una posible función redundante y por lo tanto que proteínas homólogas de diferentes operones puedan actuar complementando la función de otro.

Con el objetivo de estudiar experimentalmente las diferentes hipótesis obtenidas hasta el momento, se decidió realizar un análisis mutacional de cada uno de los genes del operón *mce4* identificado en *M. smegmatis* para poder demostrar el efecto de dichas mutaciones en el metabolismo del colesterol. En este sentido y para evitar posibles efectos polares, los distintos mutantes se generaron por delección mediante el sistema denominado RecET de recombinación homóloga (ver apartado 4.7. de materiales y métodos). Siguiendo esta estrategia, en primer lugar se realizó una PCR usando oligonucleótidos que contenían por una parte una región homóloga de unos 120 pb a la zona genómica que se quería mutar, y por otra parte una región homóloga de unos 20 pb al gen de resistencia a higromicina. El producto de PCR obtenido se electroporó en una cepa de *M. smegmatis* con el plásmido pJV53 (expresión de las proteínas de Lambda Red), lo que produce la incorporación del gen de resistencia amplificado en la región genómica seleccionada, creando mutantes por inserción resistentes a higromicina. En nuestro caso, la posterior expresión de la recombinasa Cre, produce la escisión de la región flanqueada por las secuencias loxP, también incluidas en los oligonucleótidos, generando el mutante por delección final. Esta estrategia fue usada para generar tanto los mutantes por delección de cada uno de los genes del operón *mce4* de manera individual, como el mutante de delección del operón *mce4* completo (Figura 40).

Los diferentes mutantes así obtenidos fueron cultivados en medio mínimo con colesterol 1.8 mM como única fuente de carbono y energía para comprobar la implicación de los diferentes genes en su metabolismo. Como se observa en la FIG X y como ocurría con la cepa *M. smegmatis* Δ 1366 (mutante de la ATPasa MceG), ninguno de los mutantes obtenidos fue capaz de crecer en colesterol incluso a tiempos largos de incubación (120 h de cultivo). Además de demostrar la

necesidad de cada uno de los genes en el transporte activo de colesterol, este resultado también indica que las proteínas homólogas de los otros operones *mce* presentes en la célula no son capaces de complementar la función del gen mutado en el operón *mce4*.

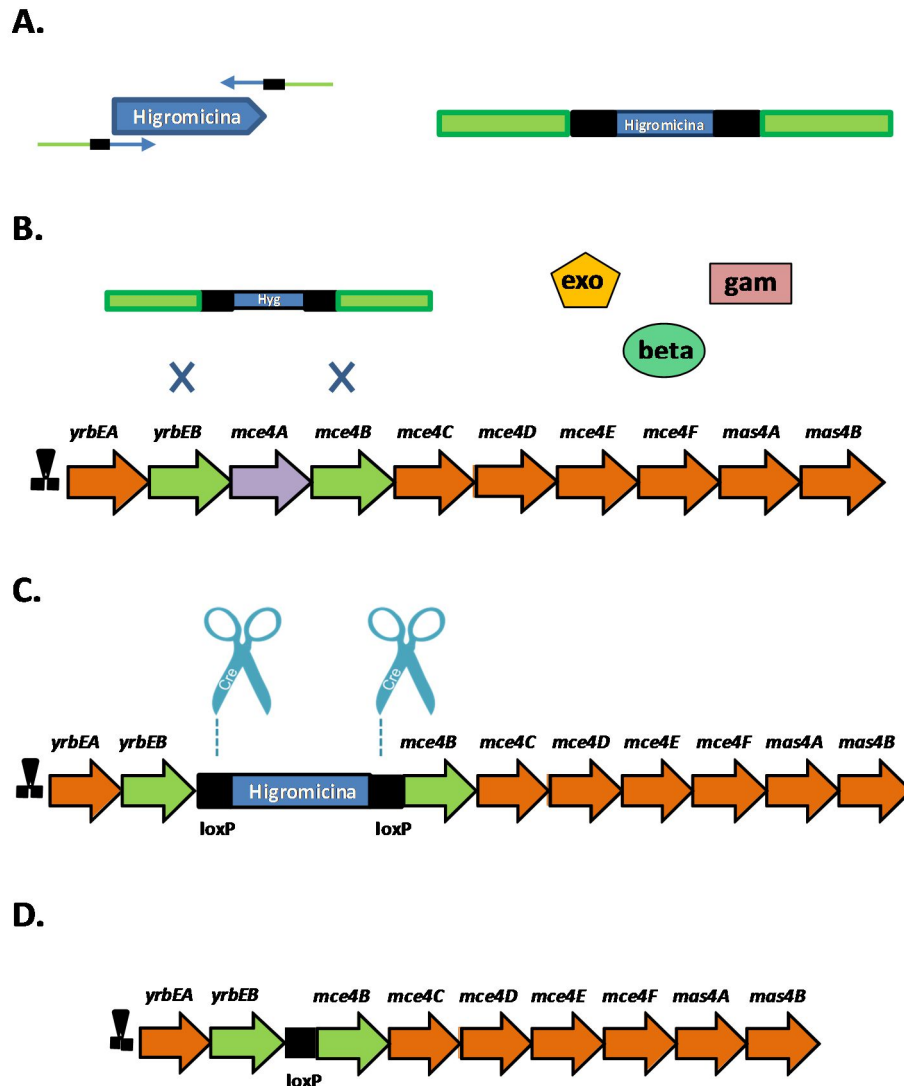
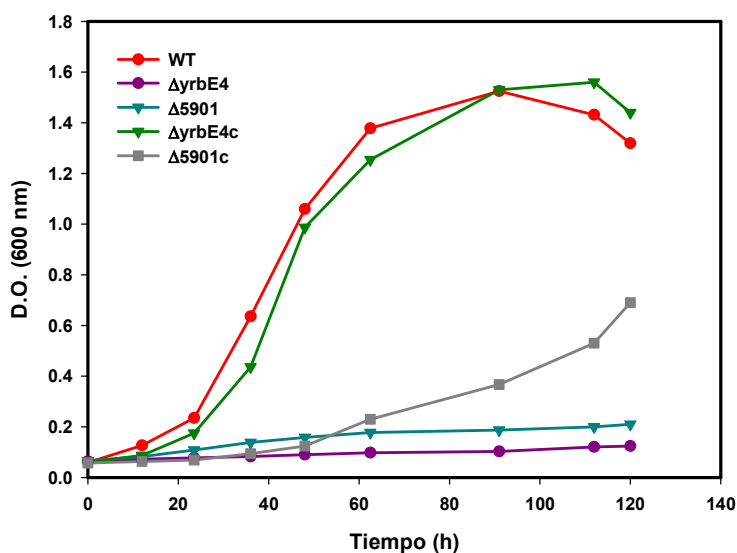


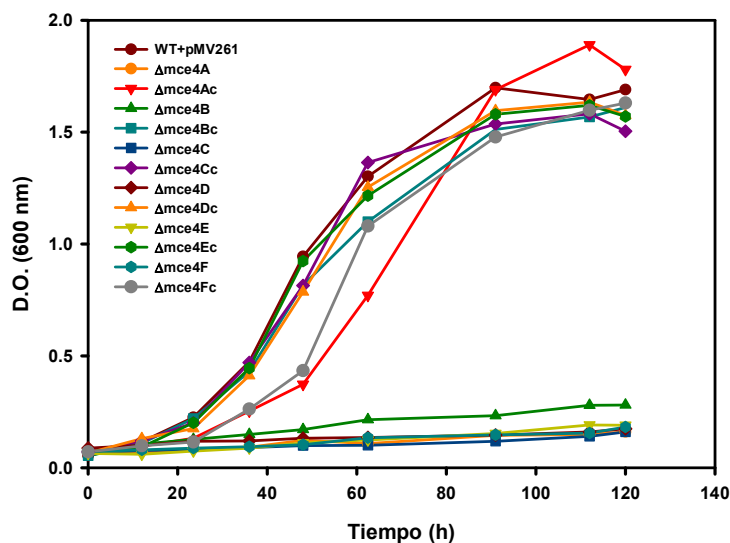
Figura 40. Sistema de recombinación RecET utilizado para la generación de mutantes. **A.** Producto de PCR obtenido consistiendo en el gen de la resistencia a higromicina flanqueado por las regiones homólogas al gen a deleccionar. **B.** El producto de PCR se electropora en la cepa diana que deberá expresar las proteínas del sistema Lambda Red, produciendo la recombinación homóloga del gen de resistencia en la región de interés. **C.** La expresión de la recombinasa Cre produce cortes en los sitios loxP. **D.** La cepa final porta la delección del gen de interés y no contiene ningún gen de resistencia.

Para demostrar que el fenotipo de crecimiento en colesterol de los mutantes obtenidos no era debido a efectos polares, éstos se complementaron con una construcción de cada gen clonado en el plásmido pMV261 bajo la expresión del promotor P_{hsp60} constitutivo en micobacterias. En la Figura 41, se muestra cómo los mutantes complementados con las diferentes construcciones recuperan los niveles de crecimiento en colesterol normales de la cepa silvestre mientras que el mutante que porta el plásmido vacío es incapaz de crecer. En el caso del mutante $\Delta 5901$ (permeasa YrbE4B) la complementación observada no es óptima (Figura 41 A), lo que sugiere que probablemente las dos permeasas presentes en el operón *mce4* deben co-expresarse para lograr un correcto ensamblaje de las mismas en membrana y posteriormente una correcta función en el transportador. De esta manera, se demuestra también que excepto en el caso de las permeasas expresadas de manera individual, el resto de genes del operón *mce4* se pueden expresar en *trans* sin alterar el correcto funcionamiento del sistema de transporte.

A.



B.



C.

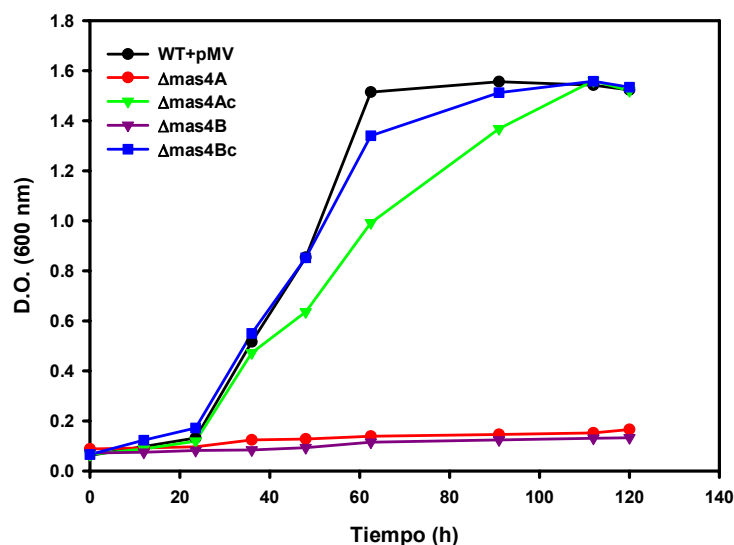


Figura 41. Curvas de crecimiento tanto de los mutantes del operón *mce4* así como las cepas complementadas (nombre indicado con una “c”) en colesterol 1.8 mM como única fuente de carbono y energía. **A.** Componentes permeasas del operón *mce4*; **B.** Proteínas de unión a sustrato (SBPs) del operón *mce4*; **C.** Proteínas Mas del operón *mce4*.

Es interesante destacar aquí que tras resultados obtenidos con la cepa *M. smegmatis* Δ1366, que posee crecimiento en colesterol cuando éste es añadido en escamas directamente al medio, se realizó la misma prueba con el mutante Δ*mce4*op que posee la delección completa del operón *mce4*. Los resultados muestran, como se observa en la Figura 42, que al igual que lo que ocurría con el mutante de la ATPasa el mutante específico del sistema Mce4 también es capaz de crecer en colesterol en condiciones saturantes del esteroide. Estos datos confirman la presencia de un sistema de transporte de colesterol alternativo al descrito hasta el momento y no relacionado con los sistemas de transporte Mce.

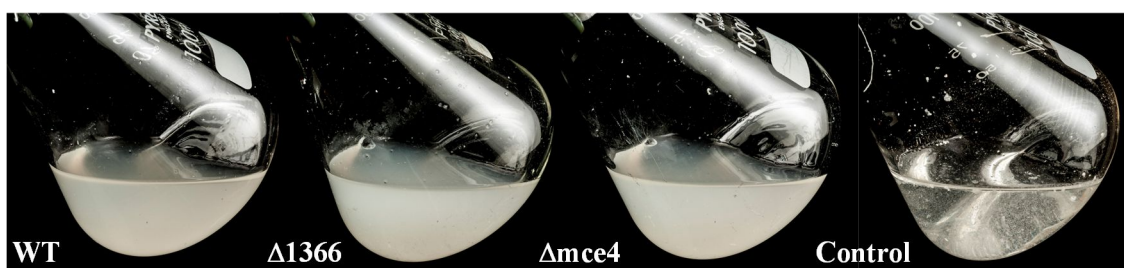


Figura 42. Crecimiento de *M. smegmatis* cepa silvestre (WT), la cepa mutante Δ1366 y la cepa mutante Δ*mce4*op en medio mínimo con colesterol añadido directamente a una concentración final de 1.8 mM. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de crecimiento durante 72 h.

Igual que se hizo con el mutante de la ATPasa MceG y aprovechando el rango de sustratos esteroideos en los que *M. smegmatis* es capaz de crecer, las diferentes cepas obtenidas se cultivaron en esteroides con diferente estructura molecular. Así, tanto la cepa silvestre como los once mutantes delecionados se cultivaron en medio mínimo con 1.8 mM de colesteno, 1 mM de fitosterol o 2.5 mM de androstenediona (AD) como única fuente de carbono y energía (datos no mostrados). En los resultados obtenidos, se confirma que ninguno de los mutantes es capaz de crecer en colesteno o fitosterol como única fuente de carbono sin embargo, el crecimiento fue normal cuando se utilizó AD como sustrato. Estos resultados, implican que los fenotipos de crecimiento en diferentes esteroides observados en el mutante de la ATPasa corresponden específicamente a la falta de actividad del operón *mce4*, cuya especificidad de sustrato se limita por tanto a moléculas esteroideas sin cadena lateral.

2.3.1. Ensayos de transporte de colesterol con radiactividad

Una vez confirmada la implicación de todos los genes que forman el operón *mce4* de *M. smegmatis* en el metabolismo de colesterol y esteroides con estructura similar, se realizaron ensayos de transporte de colesterol para confirmar su implicación en el proceso de transporte al interior celular.

Debido a la complejidad de los ensayos y al haber obtenido fenotipos de crecimiento en colesterol idénticos con todos los genes del operón, se optó por usar únicamente el mutante $\Delta 5900$ ($\Delta mce4A$) para realizar los ensayos de transporte de colesterol marcado radiactivamente en el carbono 4. Se realizaron ensayos idénticos a los llevados a cabo con el mutante $\Delta 1366$ (ver capítulo 1 de Resultados). Tal y como se muestra en la Figura 43, se observó un aumento de la radiactividad en la cepa silvestre a lo largo del tiempo de incubación hasta alcanzar 1350 cpm a los 30 min de incubación, mientras que en las mismas condiciones en el mutante $\Delta 5900$ los niveles alcanzados fueron equiparables en todo momento a los obtenidos tras la pre-incubación con el inhibidor DCCD. Por tanto y al igual que ocurrió con el mutante $\Delta 1366$ de la ATPasa MceG, los niveles de radiactividad detectados en el mutante $\Delta 5900$ se adscriben a procesos de adsorción del colesterol a la superficie celular y no a transporte propiamente dicho al interior de la bacteria. Estos resultados, confirman la implicación directa del operón *mce4* de *M. smegmatis* en el proceso de transporte activo de colesterol.

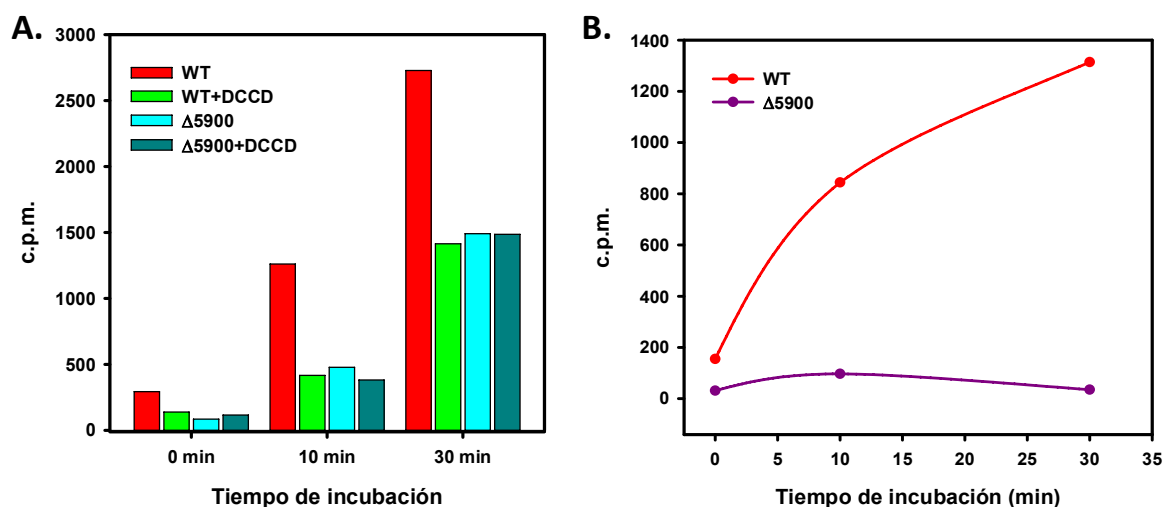


Figura 43. Ensayos de transporte con colesterol radiactivo de la cepa silvestre (WT) y el mutante $\Delta 5900$ ($\Delta mce4A$). (A) Ensayo realizado en presencia de inhibidor DCCD (B) Se muestran los niveles de radiactividad tras restar la radioactividad que aporta el colesterol adherido a la superficie celular (medidas obtenidas en presencia del inhibidor DCCD).

2.4. Estudios fenotípicos de los mutantes del operón *mce4*

En el capítulo anterior se mostró un estudio fenotípico del mutante $\Delta 1366$ de la ATPasa MceG en el que se relacionó la función de esta enzima con cambios en los componentes de la superficie celular de la bacteria. Sin embargo, esta ATPasa es responsable de energizar la totalidad de los operones *mce* presentes en la célula (6 en el caso de *M. smegmatis*) y por lo tanto, desconocíamos la identidad y/o el número de operones *mce* implicados en los cambios fenotípicos observados. Como se ha comentado en la Introducción, existen diversos estudios en *M. tuberculosis* que relacionan la función de los operones *mce* con cambios en la pared celular; así, se ha descrito que el mutante en el operón *mce1* acumula ácidos micólicos libres (Cantrell *et al.*, 2013), el mutante en el operón *mce2* acumula sulfolípidos (Marjanovic *et al.*, 2011) y el mutante en el represor del operón *mce3* presenta alteraciones en el contenido lipídico con respecto a la cepa silvestre (Santangelo *et al.*, 2009). Sin embargo y hasta el momento, el operón *mce4* ha sido únicamente relacionado con el transporte de colesterol y no existen por tanto estudios previos que asocien este sistema de transporte con ninguna otra función.

Con el objetivo de determinar si el fenotipo observado en el mutante $\Delta 1366$ era reproducible en alguno de los mutantes del operón *mce4*, se repitieron los estudios fenotípicos realizados anteriormente (ver capítulo 1 de Resultados). Así, en primer lugar las diferentes cepas mutantes se cultivaron en medio mínimo con glicerol 18 mM sin añadir ningún detergente al medio de cultivo. Sorprendentemente, el fenotipo observado en cada uno de los diferentes

mutantes del operón *mce4* fue muy similar al observado en el mutante $\Delta 1366$ (Figura 44). Si bien es cierto que la agregación obtenida parece menor a la que presenta el mutante $\Delta 1366$, es visiblemente diferente a la observada en la cepa silvestre.

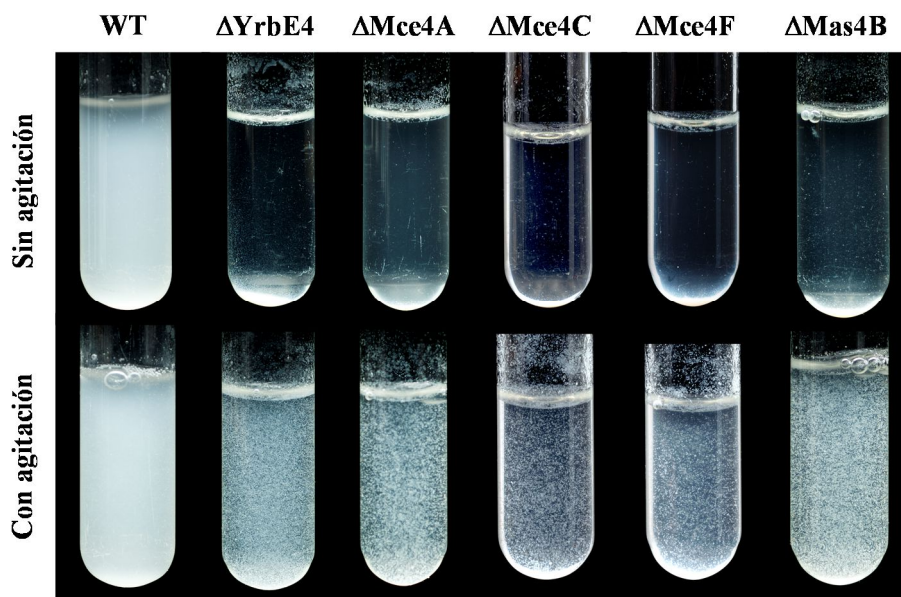


Figura 44. Estudio del fenotipo de agregación de la cepa silvestre y diversas cepas mutantes en diferentes posiciones del operón *mce4* en medio mínimo con glicerol 18 mM en ausencia de detergente.

Los estudios morfológicos realizados en placas de medio 7H10 con el colorante Rojo Congo también mostraron alteraciones en la morfología de las diferentes cepas mutantes del operón *mce4*. Estas cepas, presentaron colonias distintivas con pequeñas prolongaciones en su superficie, con una morfología similar a la observada en el mutante $\Delta 1366$ pero sin la coloración rojiza característica de la acumulación de compuestos hidrofóbicos (Figura 45).

Cuando se realizaron ensayos de complementación con el plásmido pMV5900 que porta el gen *MSMEG_5900* sobre el mutante $\Delta 5900$ se comprobó que el fenotipo se revertía y se demostró que los cambios observados eran debidos a las mutaciones específicas realizadas en el operón *mce4*. Los estudios fenotípicos tanto en medio líquido como en medio sólido confirmaron que se producen alteraciones en la superficie celular de los mutantes del operón *mce4*, sugiriendo por primera vez una implicación de este sistema en las modificaciones de algún componente de la misma.

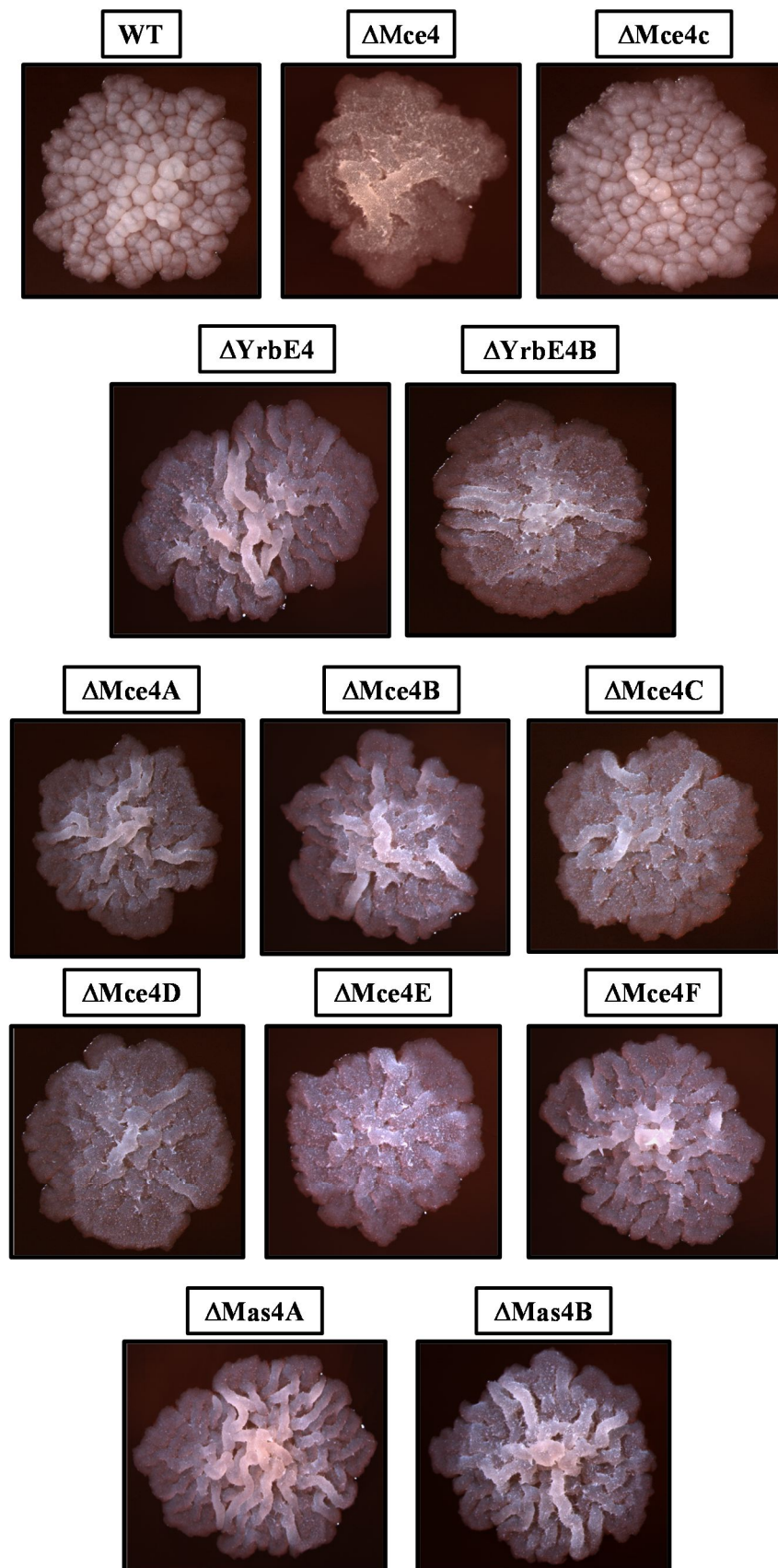


Figura 45. Estudios de morfología de colonia de los diferentes mutantes específicos del operón *mce4* así como de una de las cepas complementadas (Δ Mce4c) usando el colorante Rojo Congo en placas de 7H10.

2.5. Análisis de la composición de ácidos micólicos en el mutante *M. smegmatis* $\Delta mce4op$

Una vez verificada la implicación del operón *mce4* en los cambios observados en la superficie celular y conociendo los resultados del análisis de ácidos micólicos obtenidos para el mutante $\Delta 1366$, nos propusimos investigar si el operón *mce4* podría estar implicado también en este tipo de cambios.

El análisis de los ácidos micólicos se realizó en este caso con el mutante $\Delta mce4op$ que contiene la delección completa del operón *mce4* pero que posee el gen *MSMEG_1366* de la ATPasa MceG, por lo que el resto de los operones *mce* permanecen funcionales. En una primera aproximación, se lanzaron cultivos de la cepa silvestre y del mutante $\Delta mce4op$ en medio mínimo con glicerol 18 mM y Tween80 de los que se recogieron alícuotas tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento. Tras realizar la extracción de los ácidos micólicos de las diferentes alícuotas, las muestras se analizaron mediante TLC en una dimensión. En los resultados mostrados en la Figura 46, se puede observar que el patrón de bandas correspondientes a los tres tipos de ácidos micólicos característicos en *M. smegmatis* es idéntico en ambas cepas y en ambas condiciones probadas.

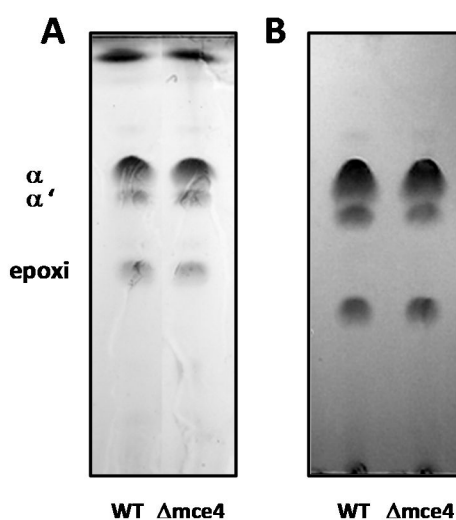


Figura 46 Análisis de los MAMEs (*Mycolic Acid Methyl Esters*) tanto de la cepa silvestre como del mutante $\Delta mce4op$ cultivadas en medio mínimo con glicerol 18 mM. Se muestran los resultados obtenidos en fase exponencial (A) y en fase estacionaria (B) de crecimiento.

En el caso del mutante $\Delta 1366$ se observaron diferencias en la composición de ácidos micólicos cuando se inducía la respuesta estricta con D,L-norvalina (ver apartado 1 de Resultados). Para comprobar si sucedía lo mismo en el mutante $\Delta mce4$, tanto la cepa silvestre como el mutante se cultivaron en medio mínimo con glicerol 18 mM hasta una DO_{600} de 0.5, momento en el cual se añadió D,L-norvalina a una concentración final de 0.5 mg/ml. Tras inducir durante 7 h la

respuesta estricta, se recogió una alícuota del cultivo para realizar la extracción de los ácidos micólicos.

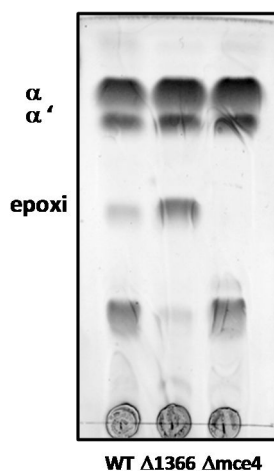


Figura 47 Análisis de la composición en MAMEs (*Mycolic Acid Methyl Esters*) de la cepa silvestre y de la cepa mutante $\Delta mce4$ en medio mínimo con glicerol 18 mM tras inducir durante 7 h la respuesta estricta con D, L-norvalina. En la figura se muestra también el análisis correspondiente a la cepa *M. smegmatis* $\Delta 1366$ para su comparación.

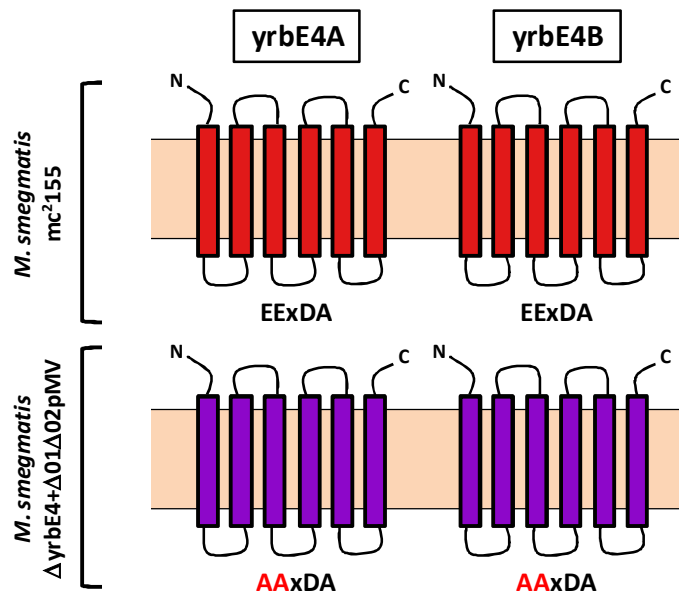
Como puede observarse en la Figura 47, en la cepa silvestre la banda correspondiente a los ácidos epoxi-micólicos disminuye notablemente de intensidad apareciendo la banda de menor Rf. En las mismas condiciones y al contrario de lo observado para el mutante $\Delta 1366$, el mutante $\Delta mce4$ también muestra la banda de menor Rf mientras que la banda de los epoxi-micólicos desaparece completamente. Los resultados obtenidos indican que el operón *mce4* está implicado en cambios en la superficie de membrana pero que que estos cambios no están relacionados con modificaciones en la composición de ácidos micólicos bajo situaciones de estrés metabólico inducidas por D,L-norvalina.

2.6. Estudio del dominio EExDA de las permeasas YrbE4 del operón *mce4*

Tras los análisis bioinformáticos realizados se puede concluir que junto con la ATPasa, las permeasas constituyen los elementos más conservados de los sistemas Mce. Sin embargo y como ya se comentó al inicio de este capítulo, las secuencias de aminoácidos de las permeasas Mce poseen una región diferencial con respecto a las descritas hasta el momento para otros transportadores ABC. Debido a la ausencia del denominado dominio EAA de unión a ATPasa, se decidió realizar un estudio mutacional del dominio consenso EExDA identificado en las permeasas YrbE4 para verificar si podría tener una posible función homóloga a la de la región EAA y por tanto constituir un dominio esencial para el correcto funcionamiento del operón *mce4*.

En ausencia de información estructural o funcional de las proteínas YrbE4, se decidió realizar una mutagénesis dirigida sobre los primeros residuos de la secuencia. De esta manera, los dos residuos de glutámico (E) de la secuencia EExDA fueron sustituidos por alanina (A) tanto en el gen *yrbE4A* como en el *yrbE4B* (ver apartado 4.9. de materiales y métodos) (Figura 48 A). El cambio de E por A en la región de reconocimiento de la ATPasa MalK es el que menor efecto tiene sobre la función del transportador de la maltosa (Mourez *et al.*, 1997) y por tanto nos permitiría probar la verdadera necesidad en la conservación de esta secuencia en el operón *mce4*. Ambas permeasas con las mutaciones puntuales se clonaron en el plásmido pMV261 generando la construcción pMVΔ01Δ02 que posteriormente se electroporó en el mutante $\Delta yrbE4$. Esta cepa contiene una delección de los dos genes de las permeasas del operón *mce4* lo que nos permite poder estudiar el efecto de las modificaciones del dominio EExDA sin la versión nativa de las proteínas. La cepa así obtenida se cultivó junto con la cepa silvestre y la cepa $\Delta yrbE4$ en medio mínimo con colesterol 1.8 mM como única fuente de carbono y energía para poder observar el efecto de las mutaciones puntuales en su transporte. Como puede verse en la Figura 48 B, la construcción modificada pMVΔ01Δ02 no es capaz de complementar el mutante $\Delta yrbE4$ y por tanto no muestra crecimiento en colesterol incluso a tiempos largos de incubación (120 h).

A.



B.

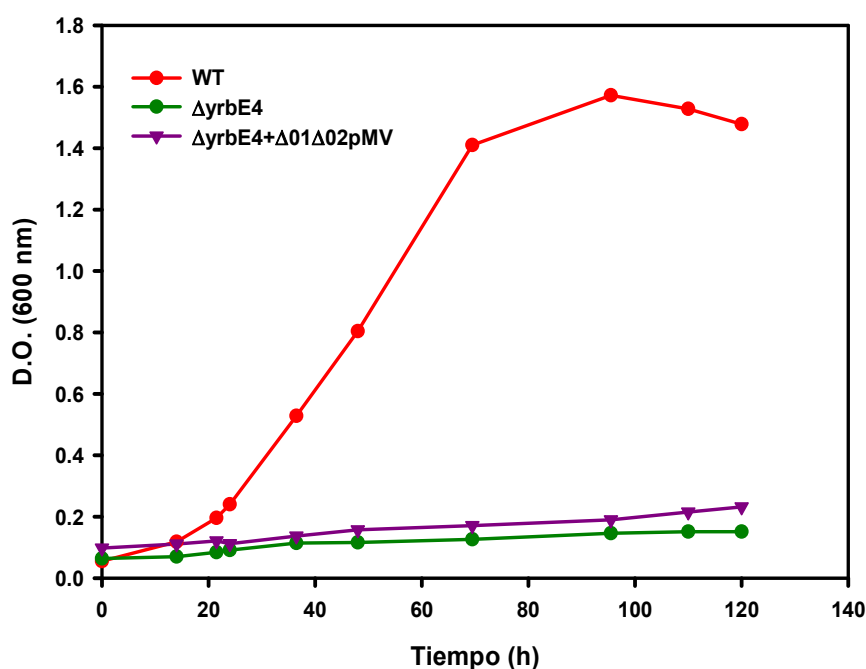


Figura 48 Estudio de la importancia de la conservación del motivo EExDA en el transporte del colesterol en *M. smegmatis* mc²155. A. Representación esquemática de las mutaciones puntuales realizadas en el dominio EExDA. B. Curvas de crecimiento de las cepas *M. smegmatis* mc²155, mutante $\Delta yrbE4$ y mutante $\Delta yrbE4$ complementadas con la construcción pMV $\Delta01\Delta02$ en medio mínimo con colesterol 1.8 mM como única fuente de carbono y energía.

Tras haber comprobado la importancia de la secuencia EExDA en el transporte de colesterol y sabiendo que el operón *mce4* está implicado en funciones relacionadas con modificaciones de la superficie celular, nos propusimos también comprobar el efecto de estas mutaciones puntuales en el fenotipo bacteriano. Para ello, la cepa se cultivó en medio mínimo con glicerol 18 mM en ausencia de detergente como en los estudios previos. Los resultados de agregación muestran un fenotipo similar al de todos los mutantes obtenidos hasta el momento, mayor agregación que la cepa silvestre indicativa de cambios en la superficie celular (Figura 49).

De estos resultados se deduce que al igual que ocurre con el bucle EAA, la secuencia EExDA presente en las permeasas Mce es una secuencia esencial para el correcto funcionamiento del transportador Mce4. Al tratarse de mutaciones puntuales y no de la delección de ningún gen completo, también podemos deducir que los fenotipos observados hasta el momento en nuestros estudios previos son debidos a la ausencia de función del transportador y no a cambios estructurales de la membrana debidos a la ausencia del complejo Mce4.

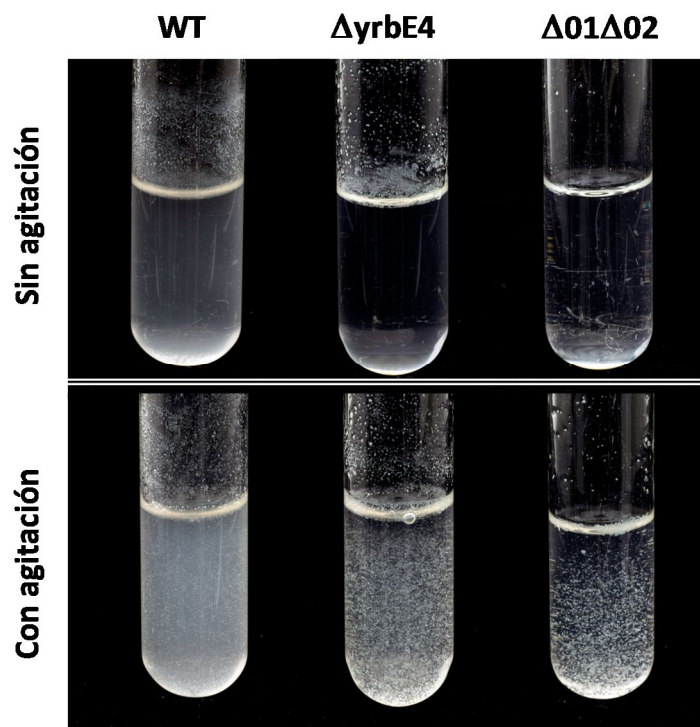
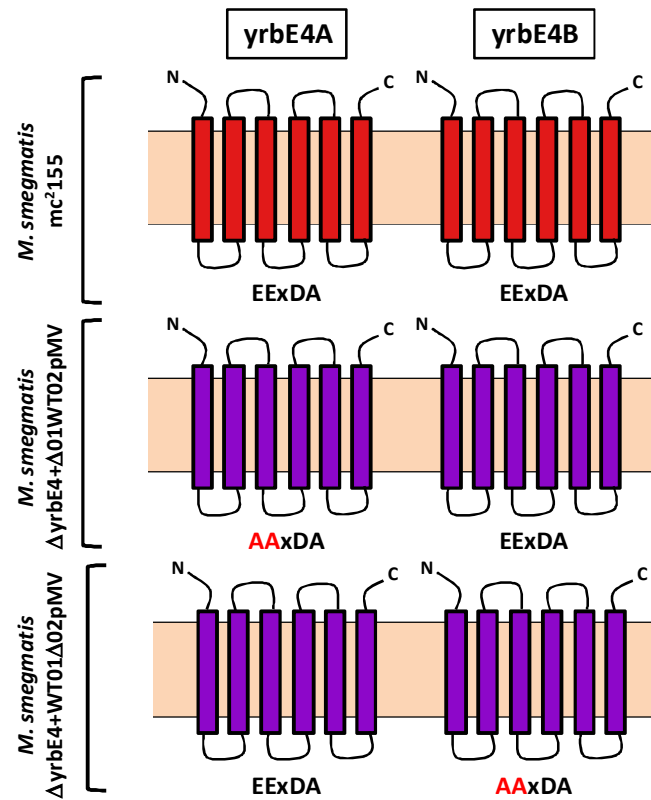


Figura 49. Fenotipo de agregación de las cepas silvestre *M. smegmatis* mc²155, el mutante $\Delta yrbE4$ y el mutante $\Delta yrbE4$ (pMV $\Delta 01\Delta 02$) en medio mínimo con glicerol 18 mM en ausencia de detergente.

Estudios anteriores realizados por los mismos autores, mostraron que mutaciones individuales en las regiones EAA de las permeasas MalG y MalF generaban fenotipos diferentes, sugiriendo que no funcionaban de manera simétrica (Mourez *et al.*, 1997). Para determinar si en el caso de las permeasas YrbE4 se observaba un efecto similar, se realizaron dos nuevas versiones mutadas utilizando el mismo procedimiento explicado anteriormente. La primera de ellas contiene la versión mutada de la permeasa YrbE4A* y la versión nativa de la permeasa YrbE4B (cepa nombrada $\Delta 01WT02$) y la segunda de ellas contiene la versión nativa de la permeasa YrbE4A y la versión mutada de la permeasa YrbE4B* (cepa nombrada WT01 $\Delta 02$) (Figura 50 A). Ambas secuencias modificadas se clonaron en el plásmido pMV261 y posteriormente se electroporaron en el mutante $\Delta yrbE4$ para observar el efecto de las mutaciones en el transporte de colesterol. Las cepas generadas junto con la silvestre y el mutante $\Delta yrbE4$ se cultivaron en medio mínimo con colesterol 1.8 mM como única fuente de carbono y energía. Además y en paralelo, se realizaron los estudios de agregación cultivando las mismas cepas en medio mínimo con glicerol 18 mM sin añadir ningún detergente. Los resultados mostrados en la Figura 50 B indican que ninguna de las dos versiones creadas es capaz de crecer en colesterol y que además presentan un fenotipo diferencial de agregación, mostrando un comportamiento idéntico al observado en la cepa con las dos permeasas mutadas (Figura 51).

A.



B.

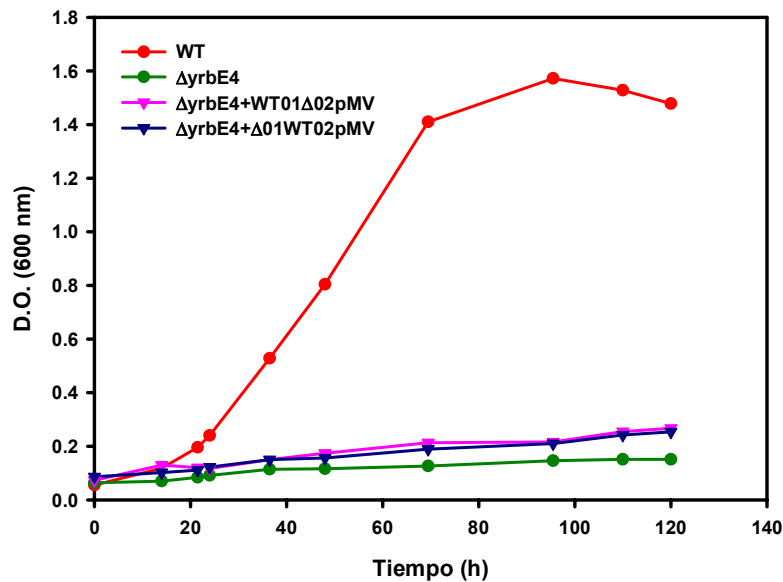


Figura 50. A. Representación esquemática de las mutaciones puntuales realizadas en el dominio EExDA. B. Curvas de crecimiento de las cepas *M. smegmatis* mc^2155 , mutante $\Delta yrbE4$ y mutante $\Delta yrbE4$ complementadas con la construcción pMVWT01 Δ 02 o pMV Δ 01WT02 en medio mínimo con colesterol 1.8 mM como única fuente de carbono y energía.

Los resultados obtenidos con los mutantes de cada una de las permeasas YrbE4 muestran un fenotipo idéntico tanto de ausencia de crecimiento en colesterol como de agregación en medio líquido sin detergente. Por tanto, y en el caso de las proteínas YrbE4, los resultados indican que la integridad de la secuencia EExDA de ambas permeasas es esencial para el correcto funcionamiento del transportador de colesterol.

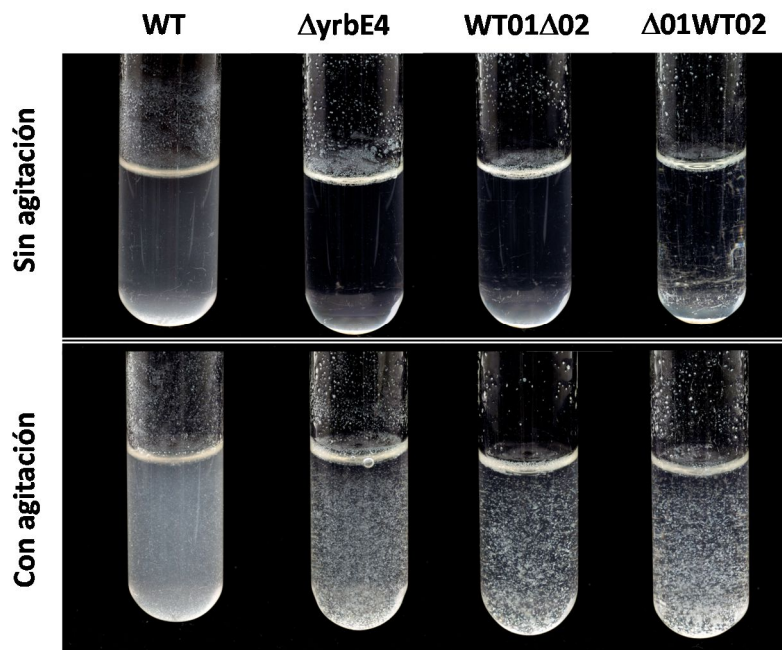


Figura 51. Fenotipo de agregación de las cepas *M. smegmatis* mc²155, mutante $\Delta yrbE4$ y mutante $\Delta yrbE4$ con la construcción pMVWT01Δ02 o pMVΔ01WT02 en medio mínimo con glicerol 18 mM en ausencia de detergente.

3. Aplicaciones biotecnológicas del estudio del transporte de esteroides

3.1. Caracterización de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa que cataliza el primer paso de la degradación del colesterol en *M. smegmatis* mc²155

Como ya se ha comentado en la Introducción, el primer paso en el catabolismo del colesterol es, según las rutas postuladas hasta el momento, la oxidación de colesterol a 5-colesten-3-ona. Esta transformación puede estar catalizada además de por enzimas del tipo colesterol oxidasa, por las hidroxiesteroide deshidrogenasas. Así, Horinouchi *et al.* (1991) describieron por primera vez una colesterol deshidrogenasa NAD(P)-dependiente en *Nocardia* sp. responsable de esta transformación. Años más tarde, la completa caracterización bioquímica de una 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en *M. tuberculosis* (Yang *et al.*, 2007) permitió entre otras cosas identificar diferentes sustratos de la enzima y la existencia de posibles inhibidores, información que posibilitaría el bloqueo de esta ruta que el patógeno usa durante la fase de infección crónica. En *M. smegmatis* mc²155 ha sido demostrado que este paso es llevado a cabo principalmente por una 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD) perteneciente a la superfamilia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR) codificada por el gen *MSMEG_5228* (Uhía *et al.*, 2011), que presenta una identidad del 77% con la proteína homóloga de *Nocardia*. En *M. smegmatis* mc²155 y pese a la confirmación de su función dentro de la ruta de degradación del colesterol, la falta de un sistema optimizado de expresión de proteínas ha imposibilitado hasta el momento la completa caracterización bioquímica de esta enzima.

3.1.1. Modelado de la proteína MSMEG_5228

La enzima 3 β HSD presenta los dominios característicos de proteínas de la superfamilia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR) (Oppermann *et al.*, 2003), que forman una gran familia de proteínas funcionalmente heterogénea. Pese a que la elevada heterogeneidad funcional explica las bajas identidades de secuencia existente entre los diferentes miembros de esta familia (alrededor de un 15-20%), todas las estructuras tridimensionales disponibles hasta el momento presentan patrones de plegamiento α/β similares, con una lámina β central típica de plegamiento de Rossmann (motivo estructural de unión a NAD).

Para conocer mejor las características estructurales de la principal 3 β HSD presente en la degradación del colesterol en *M. smegmatis*, en una primera aproximación se realizó su modelado por homología. Para ello, la secuencia de la proteína MSMEG_5228 se comparó con las secuencias de proteínas existentes en la base de datos PDB a través del programa BLAST. Posteriormente se llevó a cabo la predicción de su estructura tridimensional utilizando el programa SWISS-MODEL SERVER tomando como molde la proteína UDP-N-2 acetilglucosamina 4-epimerasa de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 1sb8) (Figura 52). Tras generar el modelo, se realizó un alineamiento de secuencias de las proteínas más similares

estructuralmente que se reajustó manualmente de acuerdo al modelo de plegamiento obtenido (Figura 53).

Como se observa tanto en el alineamiento como en el modelo de plegamiento obtenido, las proteínas identificadas como similares estructuralmente a la 3 β HSD MSMEG_5228 presentan dos motivos principales bien diferenciados. El primero es un motivo rico en Gly del tipo Gly-X-Gly-(X)₂-Gly-(X)₁₀-Gly (donde X representa cualquier aminoácido) localizado en la región N-terminal que se encuentra relativamente conservado en todas las estructuras comparadas y que está compuesto por tres o más láminas β -paralelas enlazadas mediante hélices α en el orden β - α - β - α - β . Este motivo denominado motivo Rossmann es característico de los dominios de unión a NAD de muchas deshidrogenasas NAD(P)-dependientes (Scrutton *et al.*, 1990) y por tanto presenta un elevado grado de conservación.

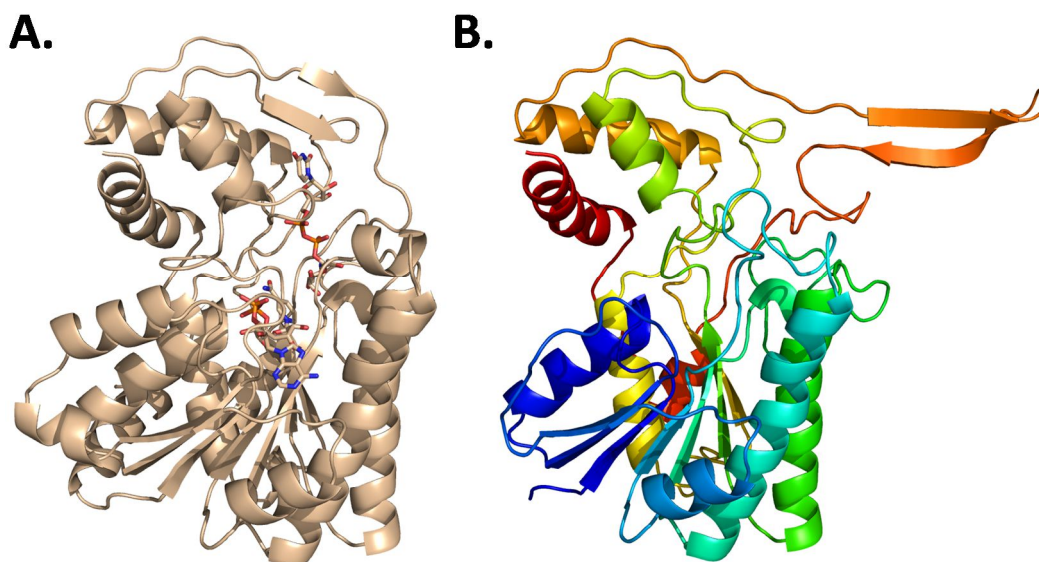


Figura 52. Predicción de la estructura tridimensional de la proteína 3 β HSD tomando como modelo la UDP-N-2 acetilglucosamina 4-epimerasa de *Pseudomonas aeruginosa*. La proteína molde se muestra en el panel (A) y el modelo resultante para la enzima MSMEG_5228 en el panel (B). Se incluyen en la estructura el cofactor y el sustrato conocidos de la enzima.

El segundo motivo se localiza en la región C-terminal y es responsable de la unión del sustrato específico de cada enzima. Como se observa en el alineamiento de secuencias con respecto a la estructura (Figura 53) se trata de una zona mucho más variable debido a que todas las proteínas comparadas en el alineamiento tienen orígenes y funciones muy diferentes por lo que aunque la molécula de colesterol encaja en la estructura obtenida no es posible afirmar que el modelo propuesto para esta zona sea totalmente fiable.

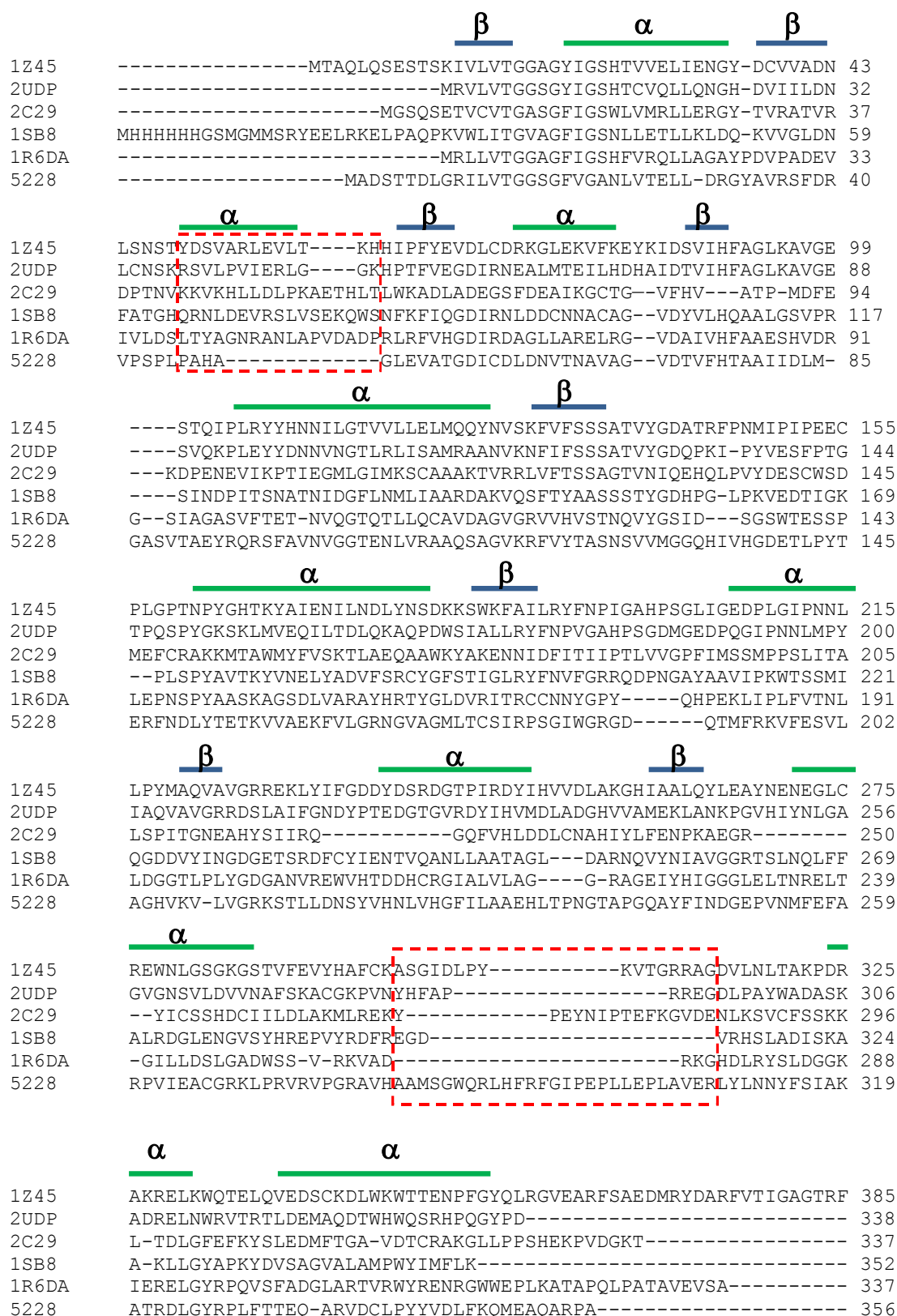


Figura 53. Alineamiento en base a la estructura de la proteína MSMEG_5228 con respecto a la proteína PDB 1sb8 y el resto de las proteínas identificadas como estructuralmente similares. Se indican las posiciones correspondientes a hélices α y láminas β (líneas verdes y azules respectivamente) así como las dos regiones consideradas de bajo grado de confianza (recuadros rojos).

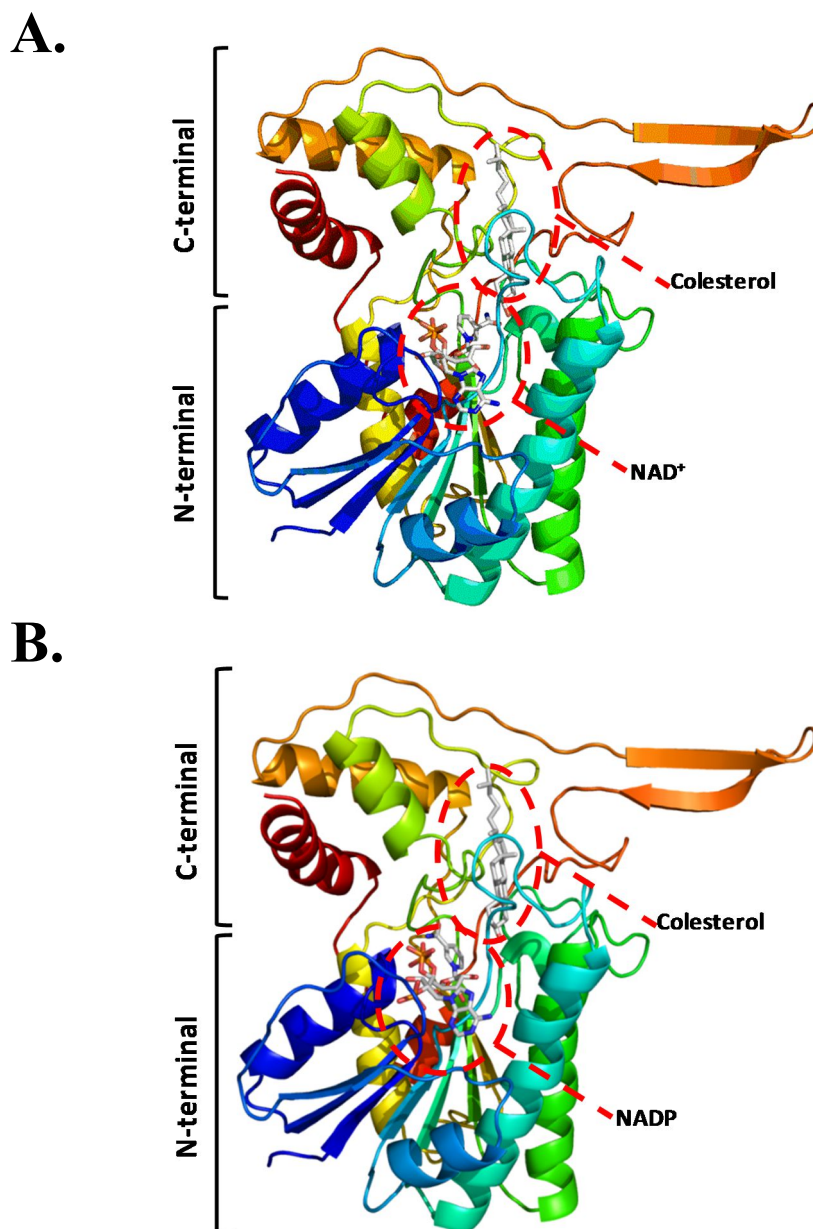


Figura 54. A. Modelo propuesto para la proteína MSMEG_5228 con NAD⁺ como cofactor y colesterol como sustrato. B. Modelo propuesto para la proteína MSMEG_5228 con NADP como cofactor y colesterol como sustrato.

El alineamiento estructural de las secuencias permite además diferenciar especialmente dos zonas en el modelo que presentan un grado de confianza bajo (Figura 53, recuadros rojos), ya que aunque han sido modeladas intentando ajustarse a la proteína 1sb8, el análisis estructural y las características de la secuencia revelan que probablemente la conformación real de estas zonas sea diferente a la propuesta por el modelo. En cuanto a las posibles características bioquímicas deducidas a partir del modelo obtenido, se puede observar que incluyendo los posibles cofactores de la reacción en la estructura, tanto el NAD⁺ como el NADP encajan en el bolsillo catalítico del modelo propuesto y por tanto ambos podrían estructuralmente estar

involucrados en la reacción catalizada por la proteína MSMEG_5228 (Figura 54). Las características bioquímicas del sustrato natural de la enzima (colesterol) sugieren también que la otra zona modelada con un bajo grado de confianza, i.e., la región comprendida entre los aminoácidos 280-309, podría actuar como una especie de tapadera móvil proporcionando el ambiente altamente hidrófobo necesario para interaccionar con la molécula de colesterol.

3.1.2. Clonaje y expresión heteróloga del gen *MSMEG_5228* en *E. coli*

Para caracterizar el producto del gen *MSMEG_5228* se procedió en primer lugar a su clonación e hiperexpresión en *E. coli*. Para ello, el gen fue amplificado por PCR usando los oligonucleótidos pET5228_F y pET5228_R (Tabla 4) utilizando como molde el DNA genómico de *M. smegmatis* mc²155. El producto de PCR obtenido fue digerido con las enzimas *NdeI/HindIII* y posteriormente clonado en el vector de hiperexpresión pET-29a (+) generándose la construcción pET5228.

La hiperexpresión en *E. coli* se ensayó en presencia de diferentes concentraciones de inductor de la expresión (IPTG) así como a diferentes temperaturas y velocidades de agitación con el fin de aumentar la solubilidad de la proteína recombinante. De todas las condiciones probadas, se observó una mayor producción de proteína en la fracción soluble a 18 °C y 100 rpm a las 18 h de cultivo. Aun así y como puede observarse en la Figura 55, la mayor parte de la proteína se encontraba en la fracción insoluble y por tanto inactiva.

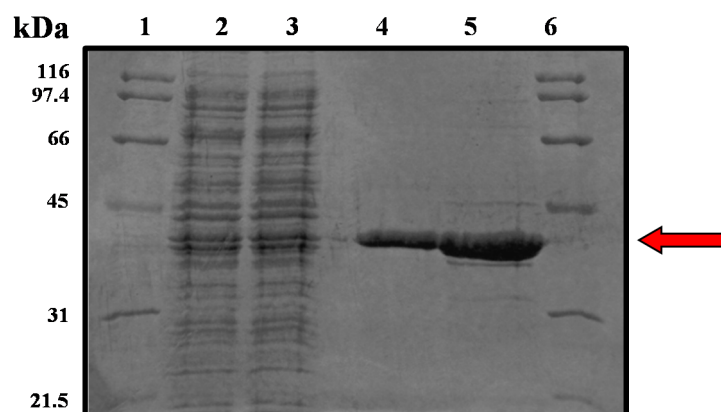


Figura 55. Gel SDS-PAGE en el que se muestra la expresión de la proteína MSMEG_5228 en *E. coli* BL21 (DE3). 1. Marcadores de peso molecular (en el margen izquierdo de la figura se detallan los pesos moleculares de los marcadores). 2. Extracto proteico de *E. coli* BL21 (DE3) (pET5228) inducida 18 h a 18 °C con IPTG 0.1 mM. 3. Extracto proteico de *E. coli* BL21 (DE3) (pET5228) inducida 18 h a 18 °C con IPTG 0.2 mM 4. Fracción insoluble de *E. coli* BL21 (DE3) (pET5228) inducida 18 h a 18 °C con IPTG 0.1 mM. 5. Fracción insoluble de *E. coli* BL21 (DE3) (pET5228) inducida 18 h a 18 °C con IPTG 0.2 mM 6. Marcadores de peso molecular. Se indica con una flecha la posición correspondiente a la 3βHSD según peso molecular.

3.1.2.1. Ensayos enzimáticos con extractos proteicos de *E. coli* BL21 (pET5228)

Como primera aproximación al estudio de la deshidrogenasa MSMEG_5228 y aunque la cantidad de proteína soluble obtenida fuera muy baja, se realizaron ensayos enzimáticos con los extractos proteicos obtenidos a partir de la cepa *E. coli* BL21 (pET5228). Para ello se utilizó como sustrato la trans-dehidroepiandrosterona (DHEA), producto con el cual se habían obtenido los mejores datos de actividad en estudios previos realizados con la proteína homóloga de *M. tuberculosis* (Yang *et al.*, 2007). Sin embargo, los ensayos realizados mostraron una actividad específica muy baja que fue atribuida a artefactos derivados de las condiciones de cultivo (datos no mostrados) y por tanto, se consideró que estos extractos proteicos no mostraron actividad alguna.

3.1.3. Utilización de *R. erythropolis* IGTS8 como hospedador para la expresión heteróloga de la enzima MSMEG_5228

3.1.3.1. Clonaje y expresión heteróloga del gen MSMEG_5228 en *R. erythropolis* IGTS8

Como alternativa ante la imposibilidad para expresar y ensayar de manera efectiva la proteína MSMEG_5228 en *E. Coli*, se probó el sistema de expresión pTip (Nakashima *et al.*, 2004) en *Rhodococcus*, una bacteria más próxima filogenéticamente a *Mycobacterium*. Para ello el gen MSMEG_5228 se subclonó en el vector pTIPQC1 a partir de la construcción pET5228 utilizando las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*. Este plásmido contiene además de los genes de resistencia a ampicilina (Ap^R) y cloranfenicol (Cm^R), la secuencia del activador transcripcional TipAL, que permite el control de la expresión del gen clonado mediante la adición de tioestreptona.

El plásmido resultante pTIP5228 se electroporó en células competentes de *R. erythropolis* IGTS8 obteniéndose la cepa recombinante *R. erythropolis* IGTS8 (pTip5228). Para llevar a cabo la producción de la proteína MSMEG_5228, la cepa *R. erythropolis* IGTS8 (pTip5228) se cultivó en medio LB y se indujo en presencia de tioestreptona (1 µg mL⁻¹) durante 17 h a 30 °C. Se obtuvieron los extractos proteicos y se analizaron mediante SDS-PAGE. En estas condiciones se detectaron los mayores niveles de proteína soluble que permitieron su utilización en posteriores ensayos enzimáticos (Figura 56).

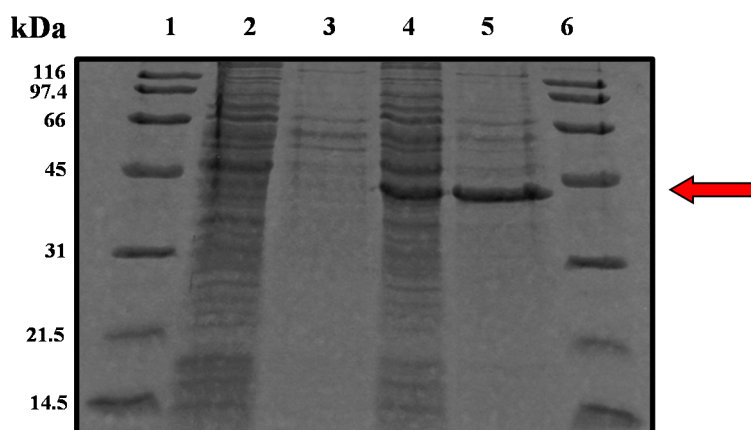


Figura 56. Gel SDS-PAGE en el que se muestra la expresión de la proteína MSMEG_5228 en *R. erythropolis* IGTS8. 1. Marcadores de peso molecular (en el margen izquierdo de la figura se detallan los pesos moleculares de los marcadores). 2. Extracto proteico de *R. erythropolis* IGTS8 (pTipQC1) (control negativo de expresión) inducida 17 h a 30 °C con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tioestreptona. 3. Fracción insoluble de *R. erythropolis* IGTS8 (pTipQC1) (control negativo de expresión) inducida 17 h a 30 °C con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tioestreptona. 4. Extracto proteico de *R. erythropolis* IGTS8 (pTip5228) inducida 17 h a 30 °C con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tioestreptona. 5. Fracción insoluble de *R. erythropolis* IGTS8 (pTip5228) inducida 17 h a 30 °C con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tioestreptona. 6. Marcadores de peso molecular. El peso molecular de 3 β HSD se ajusta al teórico calculado por el programa Compute pI/Mw del servidor Expasy (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html): 38.8 KDa (Señalizado con una flecha).

3.1.3.2. Caracterización bioquímica de la enzima recombinante MSMEG_5228 producida en *Rhodococcus erythropolis* IGTS8

La hiperproducción de la deshidrogenasa en *R. erythropolis* IGTS8 (pTip5228) permitió realizar por primera vez ensayos bioquímicos con la enzima MSMEG_5228. Con el fin de realizar la caracterización bioquímica de la enzima, los extractos proteicos se ensayaron en diferentes condiciones que se detallan a continuación.

3.1.3.2.1. Estudio de la especificidad de sustrato de la deshidrogenasa MSMEG_5228

Para estudiar la especificidad y el rango de sustratos de la enzima MSMEG_5228, los extractos proteicos de *R. erythropolis* IGTS8 (pTip5228) se ensayaron con tres esteroides diferentes como sustratos: colesterol, pregnenolona y DHEA, todos ellos con una estructura muy similar pero con diferencias en la cadena lateral. Estos ensayos enzimáticos se realizaron en Tris-HCl, TEA y TAPS con el fin de determinar el efecto de los tampones sobre la actividad enzimática.

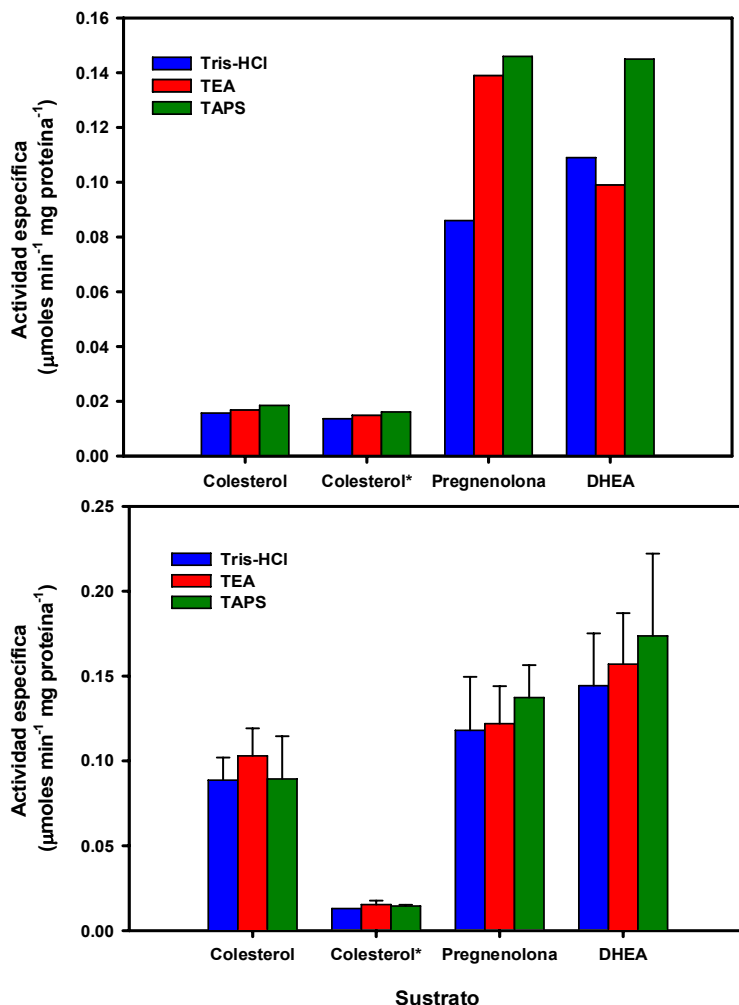


Figura 57. Ensayos de actividad enzimática con diferentes sustratos y tampones. **A.** Ensayos enzimáticos llevados a cabo a concentración final de etanol del 5%. **B.** Ensayos enzimáticos llevados a cabo a una concentración final de etanol del 3.33%. La concentración final de los sustratos fue de 150 μM , la del NAD^+ fue del 2.8 mM y la de los tampones fue de 100 mM. El volumen final de reacción fue de 600 μl y los extractos proteicos ensayados contenían entre 2.5 y 4.5 mg proteína mL^{-1} . Colesterol* se refiere a ensayos realizados con los mismos tampones a los que se les añadió 2% de Triton X-100 para aumentar la solubilidad del colesterol. La pregnenolona y el DHEA son suficientemente solubles en agua como para poder prescindir del uso de detergentes.

Como puede observarse en la Figura 57, la enzima MSMEG_5228 cataliza la reducción del NAD a NADH en presencia de colesterol, pregnenolona y DHEA. La actividad específica más elevada de la proteína MSMEG_5228 se observó usando el DHEA como sustrato, siendo entre 1.5-2.0 veces mayor que la actividad obtenida con el colesterol. Los intentos de mejorar la solubilidad del colesterol mediante el uso de detergentes dieron como resultado una pérdida de actividad, lo que puede ser debido o bien a una baja afinidad de la enzima por la superficie de las micelas del detergente, o a una desnaturalización de la enzima.

El tampón utilizado en estas condiciones de ensayo no parece ser determinante ya que las diferencias observadas entre ellos no son significativas. En cuanto al porcentaje de etanol, la disminución a 3.33% en el volumen final provoca una ligera subida de actividad con el DHEA y la pregnenolona, sin embargo en el caso del colesterol, la subida de actividad observada es notable. Tras los resultados obtenidos, los estudios posteriores de caracterización se realizaron en tampón TAPS 100 mM a pH 8.5, usando DHEA como sustrato y a una concentración final de 3.33% de etanol.

3.1.3.2.2. Dependencia de cationes de la actividad 3 β HSD

Los extractos proteicos de *R. erythropolis* IGTS8 (pTip5228) se ensayaron en presencia de diferentes concentraciones de cationes con el fin de observar un posible efecto inhibitor o activador de los mismos sobre la actividad enzimática.

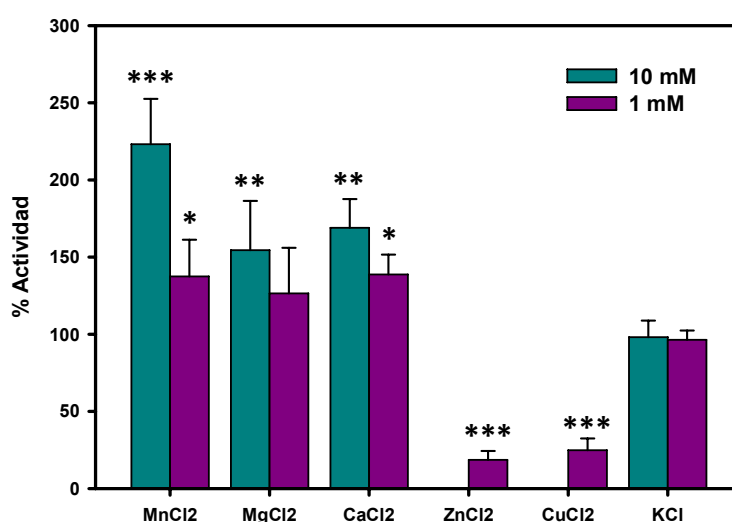


Figura 58. Ensayo de la actividad 3 β HSD en presencia de diferentes cationes. Niveles de actividad de los extractos proteicos obtenidos de la cepa *R. erythropolis* IGTS8 (pTip5228) ensayados en tampón TAPS 100 mM pH 8.5 con 2.8 mM de NAD⁺ como cofactor y 150 μ M de DHEA como sustrato. La actividad se expresa en porcentajes siendo el 100% correspondiente a una actividad específica de 0.108 μ moles min⁻¹ mg proteína⁻¹, el promedio de tres extractos proteicos con una concentración de entre 2.5 y 4.5 mg proteína mL⁻¹. Las barras muestran la desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes. Los asteriscos muestran la significancia usando el estadístico de análisis de varianza ANOVA y el test Student-Newman-Keuls: P<0,001 (***), P<0,01 (**) y P<0,05 (*).

A partir de los resultados de la Figura 58 se concluye que el Zn²⁺ y el Cu²⁺ son inhibidores de la actividad enzimática, mientras que el Mn²⁺, el Ca²⁺ y el Mg²⁺ (aunque solo a elevadas concentraciones como 10 mM) son activadores.

3.1.3.2.3. Dependencia de la fuerza iónica de la actividad 3 β HSD

Dado que la magnitud de las fuerzas electrostáticas en una disolución acuosa dependen de la fuerza iónica, tanto la actividad enzimática como la estabilidad macromolecular o la afinidad de un ligando por una cierta macromolécula estarán, en mayor o menor medida, afectadas por este parámetro. En este sentido y con el fin de estudiar un posible efecto de la fuerza iónica, se ensayaron los extractos proteicos de *R. erythropolis* IGTS8 (pTip5228) en presencia de diferentes concentraciones de NaCl.

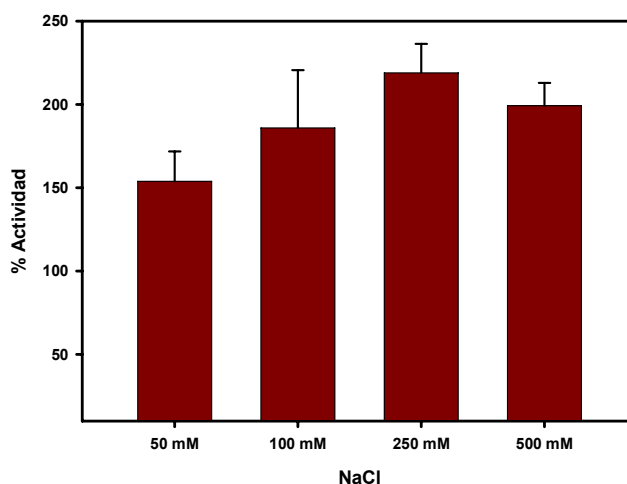


Figura 59. Efecto de la fuerza iónica en la actividad 3 β HSD. Los extractos proteicos obtenidos de la cepa *R. erythropolis* IGTS8 (pTip5228) se ensayaron en tampón TAPS 100 mM pH 8.5, con DHEA 150 μ M como sustrato, 2.8 mM de NAD⁺ y diferentes concentraciones de NaCl. La actividad se expresa en porcentajes siendo el 100% correspondiente a una actividad específica de 0.099 μ moles min⁻¹ mg proteína⁻¹ en ausencia de NaCl.

En los ensayos de la Figura 59, se observa un aumento de la actividad específica de la enzima de manera proporcional al aumento de concentración del NaCl hasta alcanzar un máximo alrededor de 250 mM, mostrando un efecto positivo de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática.

3.1.3.2.4. Dependencia de otros factores sobre la actividad 3 β HSD

Se probaron diferentes concentraciones del agente quelante EDTA para observar su efecto sobre la actividad enzimática (Figura 60). El EDTA en las condiciones ensayadas ejerce un fuerte efecto activador. Este aumento de la actividad no es fácilmente explicable ya que a la vista de los resultados anteriores la enzima se activa por metales.

Por otro lado se comprobó la especificidad del NAD⁺ sustituyéndolo en el ensayo por NADP, siendo la actividad con este cofactor muy baja. Este resultado confirmó la especificidad de la enzima MSMEG_5228 por el NAD⁺ como cofactor. Por último se verificó que la enzima

no presenta actividad con la colestenoona como sustrato, lo que confirma que la reacción observada no es reversible.

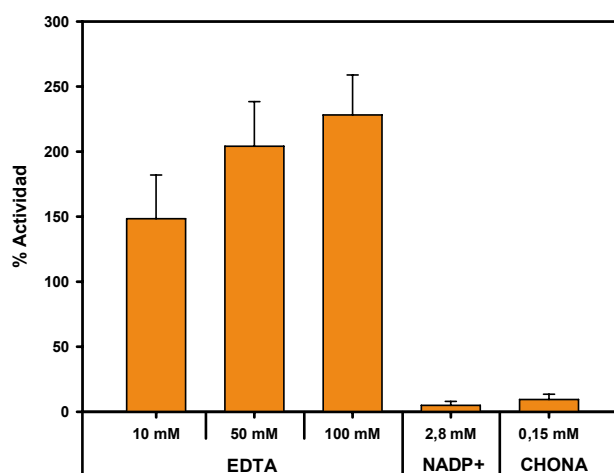


Figura 60. Ensayo de actividad enzimática con diferentes efectores. Los extractos proteicos obtenidos de la cepa *R. erythropolis* IGTS8 (pTip5228) se ensayaron en tampón TAPS 100 mM pH 8.5 con DHEA 150 μ M como sustrato, 2.8 mM de NAD^+ y a diferentes concentraciones de EDTA. Se utilizó NADP para determinar la especificidad del cofactor. Se utilizaron colestenoona y NADH para estudiar la reversibilidad de la reacción. La actividad se expresa en porcentajes siendo el 100% correspondiente a una actividad específica de 0.123 $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

3.1.3.3. Efectos de la hiperexpresión de la proteína MSMEG_5228 en la cepa *R. erythropolis* (pTip5228)

Pese a la mayor capacidad de transformación del colesterol que posee la cepa recombinante *R. erythropolis* (pTip5228), los estudios de crecimiento en colesterol realizados con esta cepa no mostraron ningún aumento en la tasa de duplicación con respecto a la cepa que porta el plásmido vacío pTipQC1 (datos no mostrados). De esto se deduce que probablemente esta primera etapa enzimática no supone un cuello de botella en el catabolismo de colesterol en *R. erythropolis*, conclusión que concuerda con los datos obtenidos previamente en *M. smegmatis* (Uhía *et al.*, 2011).

3.1.3.4. Identificación del producto de la reacción mediante LC-MS

Tal y como se ha comentado anteriormente, los ensayos enzimáticos realizados para abordar la caracterización bioquímica de la enzima MSMEG_5228 se han basado en la detección indirecta de la actividad mediante la medición de la producción de NADH. Para identificar el producto de la reacción y confirmar que las medidas de NADH realizadas se

correspondían con la actividad esperada, se realizó un ensayo *in vitro* que posteriormente se analizó mediante LC-MS para determinar los productos de la reacción.

Para ello, se reprodujeron las condiciones óptimas de ensayo enzimático estudiadas anteriormente y los extractos proteicos de *R. erythropolis* (pTipQC1) y *R. erythropolis* (pTip5228) se incubaron en un volumen de 600 μ l de tampón TAPS 100 mM pH 8.5 con 150 μ M de colesterol como sustrato y 2.8 mM de NAD⁺ como cofactor. Posteriormente, se realizó una extracción con cloroformo de las reacciones a diferentes tiempos de reacción para analizar los esteroides presentes en cada muestra mediante LC-MS. El tiempo de retención (Rt) y los espectros de masas de los diferentes picos observados en los cromatogramas permitieron la identificación de los productos de la reacción.

En la (Figura 61-1) se muestra el cromatograma de todos los iones de m/z entre 50-690 presentes en la muestra tras 1 h de incubación. Los otros cromatogramas muestran los espectros de masas obtenidos al buscar los iones característicos generados en la ruptura de la colestenoína (Figura 61-2) o del colesterol (Figura 61-3). Como puede observarse, mientras que en la cepa *R. erythropolis* (pTipQC1) no se detecta colestenoína, en la cepa *R. erythropolis* (pTip5228) este producto aparece ya tras la primera hora de ensayo. En el cromatograma obtenido para la colestenoína en la muestra de *R. erythropolis* (pTip5228) se observa además la presencia de diversos picos adicionales, probablemente compuestos esteroideos derivados de la colestenoína, ya que comparten iones de ruptura.

Como puede observarse en la Tabla 10, en el extracto de *R. erythropolis* (pTip5228), la mayor concentración de colestenoína se detecta tras la primera hora de reacción y posteriormente va disminuyendo a lo largo de la incubación hasta alcanzar una concentración de 0.025 mM a tiempos finales (25 h). Esta disminución es probablemente debida a la metabolización de la colestenoína por las enzimas endógenas presentes en el extracto proteico de *R. erythropolis*. En el caso de la construcción control con el plásmido vacío la colestenoína no se detecta a ningún tiempo de reacción sugiriendo que la expresión en niveles nativos de la proteína homóloga a la deshidrogenasa MSMEG_5228 en *R. erythropolis* no permite la acumulación de este intermediario.

Tiempo de incubación	pTip5228	pTipQC1
0 h	0	0
1 h	0.086	0
18 h	0.050	0
25 h	0.025	0

Tabla 10. Producción de colestenoína (mM) detectada en las cepas *R. erythropolis* (pTip5228) y *R. erythropolis* (pTipQC1) (control) a diferentes tiempos de incubación.

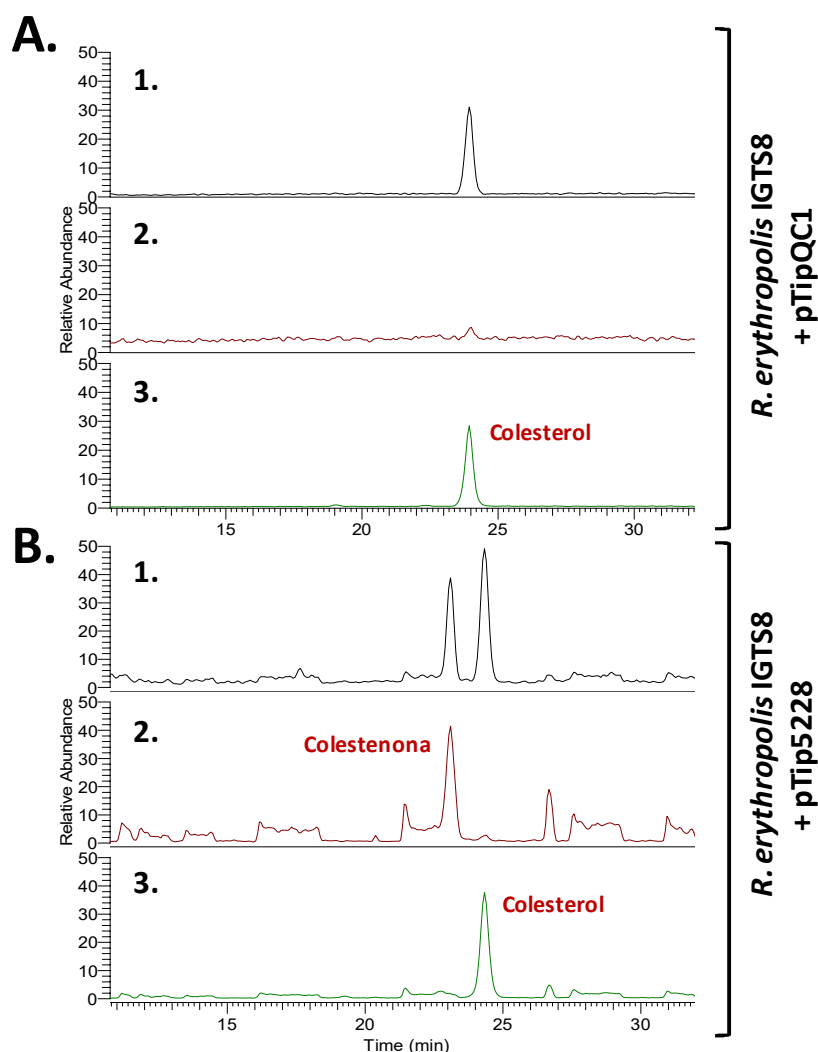


Figura 61. Análisis mediante LC-MS de las muestras procedentes de ensayos de actividad deshidrogenasa *in vitro* a tiempo final 1h empleando el colesterol como sustrato. (A) Ensayos realizados con el extracto proteico *R. erythropolis* IGTS8 (pTipQC1). (B) Ensayos realizados con el extracto proteico *R. erythropolis* IGTS8 (pTip5228). (1.) Espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 50-690 (full scan) presentes en la muestra. (2.) Espectros de masas del ión 385 característico del compuesto 4-colesten-3-ona y del ión 367 característico de su primera fragmentación. (3.) Espectro de masas del ión 369 característico del colesterol y de los iones de m/z entre 100-375 característicos de su primera fragmentación.

3.2. Utilización de *Corynebacterium glutamicum* como hospedador heterólogo en biotransformaciones esteroideas.

Pese al creciente conocimiento que existe sobre la ruta de degradación del colesterol en los géneros *Mycobacterium* y *Rhodococcus*, el uso de estos organismos en biotransformaciones de esteroides de interés industrial presenta diversos inconvenientes que se han puesto de manifiesto en los últimos años. En primer lugar, la presencia de la ruta endógena de degradación

de colesterol en estas bacterias hace necesaria la creación de mutantes específicos mediante técnicas moleculares para permitir la acumulación del intermediario de interés. En segundo lugar, se cuenta con la presencia de actividades enzimáticas que aunque no forman parte de la ruta son capaces de modificar los compuestos acumulados disminuyendo el rendimiento del producto de interés y/o dificultando su purificación en los procesos industriales.

Corynebacterium glutamicum es un microorganismo cuyo genoma se ha secuenciado y ampliamente estudiado por su uso como productor industrial de aminoácidos, motivo por el cual existen hoy en día numerosas herramientas moleculares para su modificación. De hecho a partir de su descubrimiento, el espectro de producción de *C. glutamicum* ha sido ampliado en las últimas décadas a diferentes químicos, materiales y fueles mediante múltiples estrategias de ingeniería metabólica (Becker *et al.*, 2012). Además cabe destacar que pese al gran parecido filogenético con *Mycobacterium*, esta bacteria es incapaz de utilizar colesterol como única fuente de carbono y energía, ya que carece de la mayoría de los genes relacionados con el catabolismo de esteroides.

Gracias a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, se conoce que los esteroides sin cadena lateral (como por ejemplo la androstenediona) no requieren del transporte activo mediado por el operón *mce4* para entrar en la célula. También se ha demostrado que el colesterol, la pregnenolona y el DHEA son sustratos de la enzima MSMEG_5228 que cataliza la primera reacción de la ruta de degradación de colesterol. Esta enzima es además dependiente de cofactor, por lo que su actividad es exclusivamente intracelular. Teniendo en cuenta estas premisas, se decidió clonar el gen MSMEG_5228 de *M. smegmatis* en *C. glutamicum* para contar con un sistema indirecto de detección de transporte (transporte relacionado con la aparición de producto) y así poder probar la potencialidad de este microorganismo como huésped heterólogo en la producción industrial de compuestos esteroideos de interés.

3.2.1. Clonaje del gen MSMEG_5228 en *C. glutamicum* R31

El gen MSMEG_5228 se amplificó mediante PCR usando el genoma de *M. smegmatis* como molde y utilizando los cebadores MSMEG_5228F y MSMEG_5228R (Tabla 4). El producto de PCR obtenido fue digerido con las enzimas *XhoI/AatII* y posteriormente se clonó en el vector pCGL0482 (cedido por el Dr. X. Meniche) previamente digerido con las mismas enzimas. La construcción pCGL5228 resultante que contenía el gen MSMEG_5228 bajo el control del promotor constitutivo de *Corynebacterium* pG1 se electroporó en la cepa *C. glutamicum* R31 para realizar los estudios posteriores.

3.2.1.1. Biotransformación de compuestos esteroideos por la cepa recombinante *C. glutamicum* (pCGL5228)

3.2.1.1.1. Biotransformación de dehidroepiandrosterona (DHEA) en androstenediona (AD)

El potencial catabólico de un microorganismo para llevar a cabo una biotransformación de interés se puede determinar a través de ensayos en crecimiento o ensayos con *células en reposo* (*resting cells*). Este último tipo de biotransformaciones dan lugar normalmente a mayores concentraciones de producto en menor tiempo de ensayo, ventajas deseables a la hora de realizar este tipo de estudios y por tanto, la estrategia utilizada durante esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, se realizó un ensayo de biotransformación en *resting cell* utilizando DHEA como sustrato tanto en la cepa de *C. glutamicum* (pCLG0482) que porta el plásmido vacío como en la cepa *C. glutamicum* (pCGL5228) que produce la deshidrogenasa MSMEG_5228. Para ello, ambas cepas se cultivaron en medio TSB hasta que alcanzaron la fase exponencial de crecimiento y posteriormente se incubaron en un medio que contenía 2 mM de DHEA en tyloxapol 10% como sustrato (ver apartado 2.4.1 de materiales y métodos). Para analizar el progreso de la biotransformación, se recogieron muestras a diferentes tiempos de incubación hasta un tiempo final de 28 h y posteriormente los productos se extrajeron para analizar los diferentes compuestos esteroideos presentes mediante cromatografía de capa fina (TLC) y GC-MS.

Como primer resultado se observó que en la cepa recombinante se producía la conversión de DHEA a AD mientras que la cepa control no se observaba ninguna disminución del sustrato (datos no mostrados). Sin embargo, la posterior cuantificación por GC-MS del producto obtenido mostró que pese a que el DHEA desaparecía prácticamente por completo a las 8 h de reacción en la cepa recombinante, la concentración de AD obtenida no cerraba el balance de carbono a tiempos finales del ensayo.

Tras desechar que el bajo rendimiento obtenido fuera debido a que *C. glutamicum* modificara de alguna manera el producto final de la reacción (datos no mostrados), procedimos a optimizar el proceso de extracción aumentando el volumen de cloroformo y usando métodos mecánicos para facilitar la ruptura de las bacterias. En estas condiciones, repetimos la biotransformación con el DHEA y analizamos las extracciones obtenidas por TLC (Figura 62).

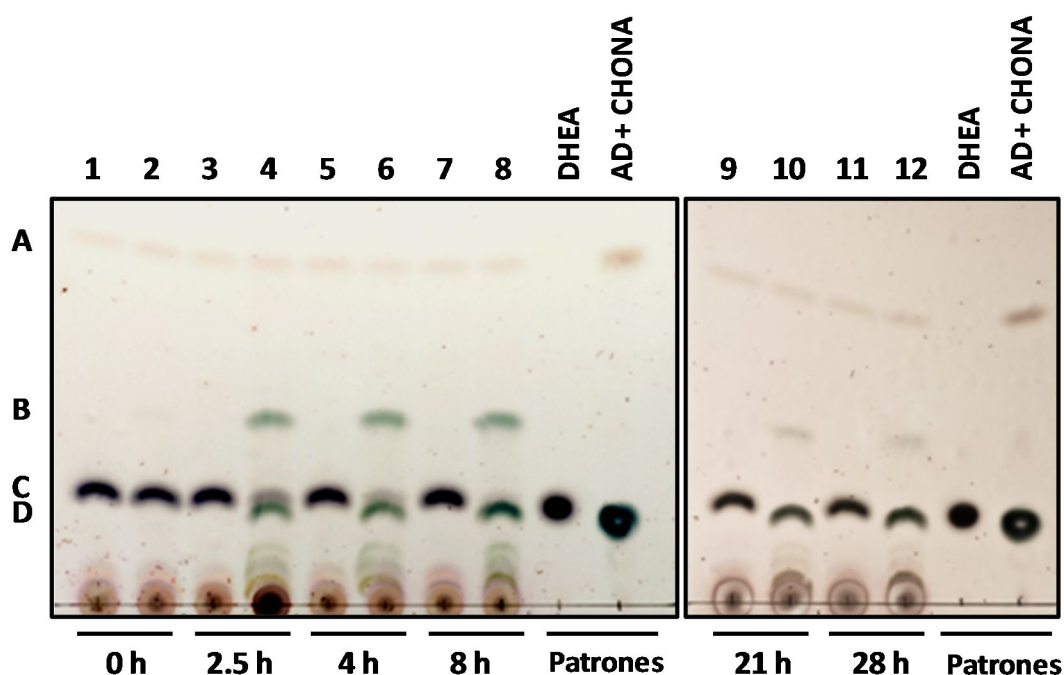


Figura 62. Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) de la biotransformación de DHEA en AD. Los carriles impares corresponden a la cepa control *C. glutamicum* (pCGL0482) y los carriles pares a la cepa recombinante *C. glutamicum* (pCGL5228). Las letras indican los diferentes compuestos esteroideos presentes en la TLC: **A.** Colestenona (CHONA), patrón interno de extracción; **B.** Compuesto no identificado; **C.** DHEA; **D.** AD.

En estas condiciones de ensayo la aparición del producto en presencia de la cepa recombinante se observa en las primeras horas del ensayo, desapareciendo prácticamente la totalidad del sustrato (DHEA) a las 8 h de incubación. Se observa también que además de AD aparece un compuesto sin identificar (Figura 62 Banda B). Este nuevo compuesto no presente en la cepa control con el plásmido vacío aparece junto con la producción de AD y va disminuyendo de concentración a los tiempos largos de incubación.

Teniendo en cuenta estos resultados y para intentar determinar la concentración del AD producido así como la naturaleza del nuevo producto detectado, analizamos los productos por GC-MS. En los cromatogramas obtenidos, se identificó en primer lugar el pico correspondiente al producto conocido (AD) cuya concentración se cuantificó tras realizar la correspondiente recta de calibrado.

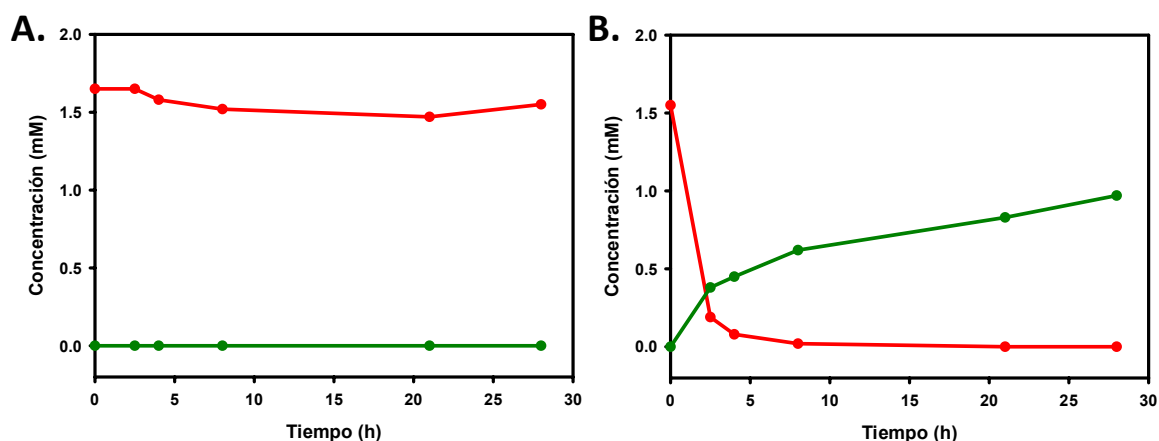


Figura 63. Biotransformación de dehidroepiandrosterona (DHEA, líneas rojas) en androstenediona (AD, líneas verdes). **A.** *C. glutamicum* (pCGL0482). **B.** *C. glutamicum* (pCGL5228).

A.	Conversión DHEA (%)	
	pCGL	pCGL5228
0 h	0	0
2.5 h	0	87.7
4 h	4.2	94.8
8 h	7.9	98.7
21 h	4.8	100
28 h	6.1	100

B.	ψ AD/DHEA (%)	
	pCGL	pCGL5228
0 h	0	0
2.5 h	0	27.9
4 h	0	30.6
8 h	0	40.5
21 h	0	53.6
28 h	0	67.7

Tabla 11. Resultados obtenidos en la biotransformación de DHEA en AD por las diferentes cepas de *C. glutamicum*. **A.** % de conversión del DHEA (sustrato). **B.** Rendimiento molar (en porcentaje) de producto obtenido respecto al sustrato consumido.

Como se observa tanto en la Figura 63 como en la Tabla 11, la cepa control no consume el sustrato ni genera el producto, confirmando los datos analizados mediante TLC. En la cepa recombinante *C. glutamicum* (pCGL5228) podemos observar prácticamente la totalidad de la desaparición del sustrato a las 8 h de biotransformación (Tabla 11 A). Sin embargo y aunque el sustrato ya esté consumido, el rendimiento de producto obtenido sigue aumentando en tiempos posteriores (Tabla 11 B), sugiriendo que el AD se sigue generando a partir de algún tipo de intermediario.

A tiempos largos de incubación (21 h y 28 h) se observan en el cromatograma (Figura 64) dos picos adicionales no presentes ni en el tiempo inicial de reacción ni en el control negativo que no pudieron ser identificados a través de las librerías disponibles para el GC-MS. El primero de los picos, con un tiempo de retención de 10.43 min, presenta el ión del TMS (72.9) y un ión característico de m/z 374.2. El segundo de los picos, con un tiempo de retención de 13.05

min, presenta el ión del TMS (72.9) y un ión característico de m/z 372.2 (Tabla 12). Este segundo pico, aparece a las 2.5 h y va disminuyendo a lo largo del tiempo de incubación, coincidiendo con lo observado para la banda desconocida en los análisis mediante TLC.

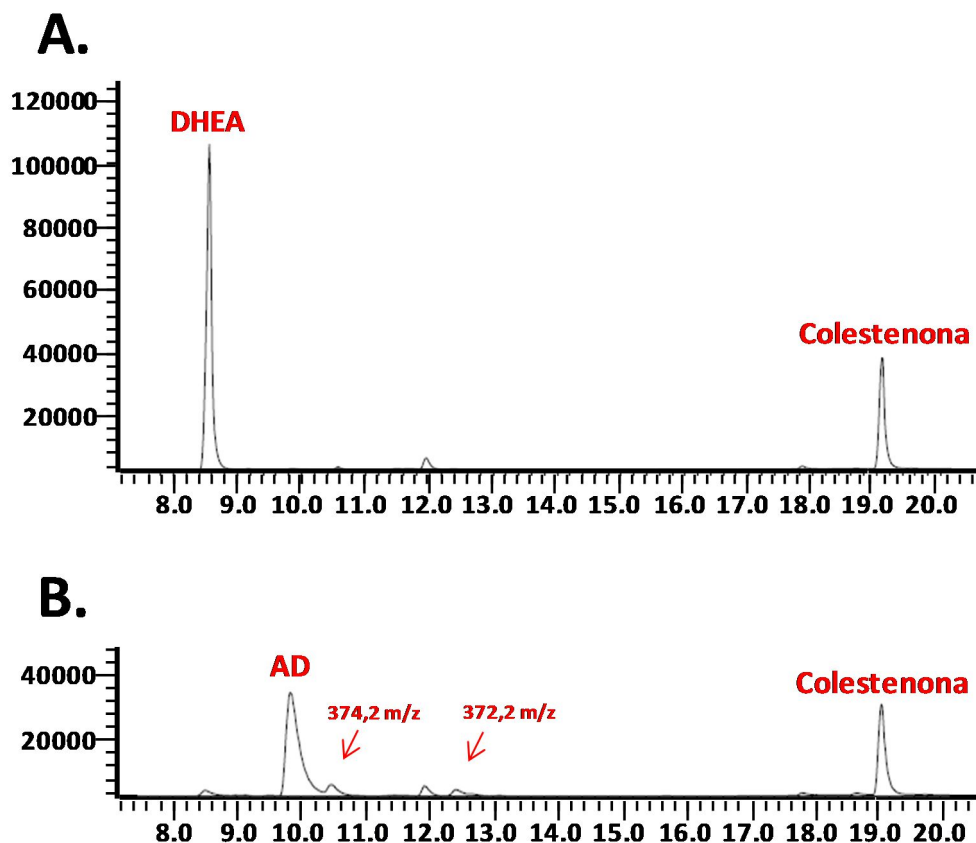


Figura 64. Análisis mediante GC-MS de las muestras procedentes de la biotransformación de la cepa *C. glutamicum* (pCGL5228) empleando DHEA como sustrato. **A.** Cromatograma a 0 h de reacción. **B.** Cromatograma tras 28 h de reacción. Se indican cada uno de los compuestos identificados gracias al uso de patrones así como los dos nuevos picos no identificados presentes en los tiempos finales de ensayo. La colestenoona se utilizó como patrón interno en el proceso de extracción.

	T. Retención	TMS	Ión característico	m/z	m/z (pico) - m/z (AD)
DHEA	8.42 min	SÍ	360.2	287.3	-
AD	9.7 min	NO	286.1	286.1	-
Pico 1	10.43 min	SÍ	374.2	301.3	15
Pico 2	13.05 min	SÍ	372.2	299.3	13.2

Tabla 12. Características de los picos obtenidos en el análisis de GC-MS llevado a cabo con la biotransformación de DHEA en AD de la cepa *C. glutamicum* (pCGL5228) a las 28 h. TMS se refiere a tetrametilsilano, compuesto utilizado para derivatizar las muestras y que se une a moléculas que poseen el radical -OH.

Teniendo en cuenta los diferentes datos así como las diferentes características de los nuevos picos (Tabla 12), la aparición de estos dos picos podría deberse a la existencia de tautómeros derivados o bien del sustrato o bien del producto de la reacción ya que ninguno de los dos está presente al inicio de la biotransformación y además uno de ellos se transforma en el producto final (AD).

3.2.1.1.2. Biotransformación de pregnenolona en progesterona

Una vez optimizada la biotransformación de compuestos esteroideos sin cadena lateral con *C. glutamicum*, se decidió probar si compuestos con cadena lateral corta eran capaces también de transportarse por difusión a través de la membrana. Para ello se diseñó un ensayo de biotransformación con la cepa de *C. glutamicum* (pCGL5228) utilizando como sustrato pregnenolona 2 mM disuelto en tyloxapol 10%. El resultado fue analizado en primer lugar por TLC.

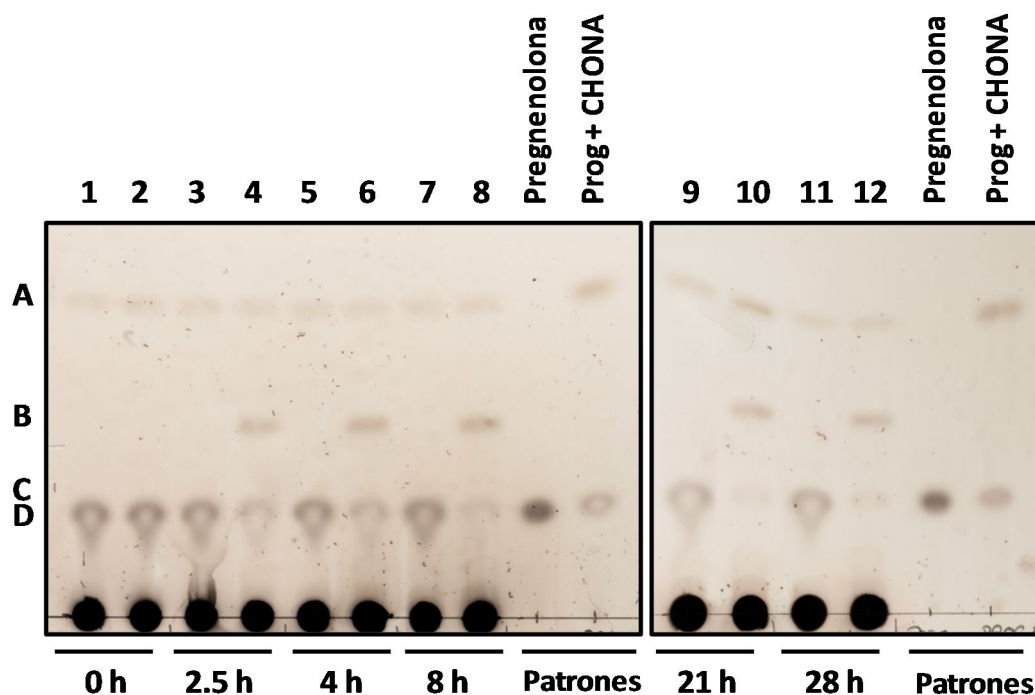


Figura 65. Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) de la biotransformación de pregnenolona en progesterona. Los carriles impares corresponden a la cepa control *C. glutamicum* (pCGL0482) y los carriles pares a la cepa recombinante *C. glutamicum* (pCGL5228). Las letras indican los diferentes compuestos esteroideos presentes en la TLC: A. Colestenona (CHONA); B. Compuesto no identificado; C. Progesterona; D. Pregnenolona.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 65, donde se puede observar que la cepa de *C. glutamicum* (pCGL5228) transforma la pregnenolona en progesterona, mientras que

Resultados

en la cepa control no se detecta disminución del sustrato ni aparición de producto. Igual que sucedía en la biotransformación de DHEA, la biotransformación de pregnenolona en progesterona genera además un compuesto no identificado no presente en los tiempos iniciales del ensayo o en el control negativo cuya concentración permanece en este caso estable a lo largo del ensayo.

Las muestras obtenidas a lo largo de la biotransformación se analizaron además mediante GC-MS para cuantificar y tratar de identificar los diferentes compuestos generados. En los resultados obtenidos la pregnenolona desaparece casi completamente tras 8 horas de incubación. Sin embargo, la concentración final de progesterona alcanzada fue únicamente de 0.5 mM a las 28 h de incubación, sugiriendo que podría estar transformándose además en otro producto adicional (Figura 66).

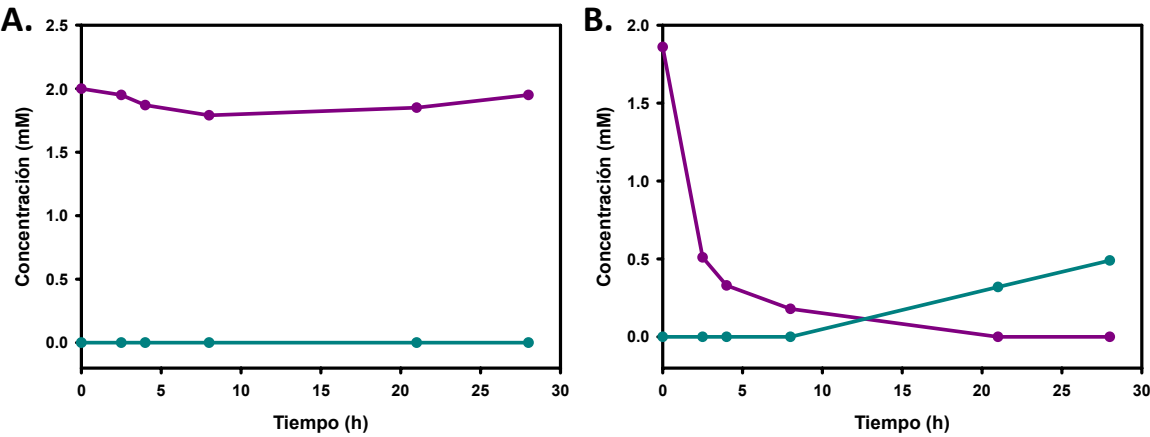


Figura 66. Biotransformación de pregnenolona (líneas moradas) en progesterona (líneas azules). A. *C. glutamicum* (pCGL0482). B. *C. glutamicum* (pCGL5228).

A.	Conversión Pregnenolona (%)	
	pCGL	pCGL5228
0 h	0	0
2.5 h	2.5	72.6
4 h	6.5	82.3
8 h	10.5	90.3
21 h	7.5	100
28 h	2.5	100

B.	ψ Prog/Preg (%)	
	pCGL	pCGL5228
0 h	0	0
2.5 h	0	0
4 h	0	0
8 h	0	0
21 h	0	17.2
28 h	0	31.7

Tabla 13. Resultados obtenidos en la biotransformación de Pregnenolona en Progesterona por las diferentes cepas de *C. glutamicum*. A. % de conversión del Pregnenolona (sustrato). B. Rendimiento molar de producto obtenido respecto al sustrato consumido

Como se observa en la Tabla 13, los cálculos de conversión y rendimiento de la biotransformación indicaron que la cepa control no consume el sustrato ni genera producto, confirmando los datos obtenidos por TLC. Por el contrario en la cepa recombinante *C. glutamicum* (pCGL5228) y de manera idéntica a lo observado en la biotransformación de DHEA en AD, se observa que aunque casi la totalidad del sustrato desaparece a las 8 h de ensayo, el rendimiento de producto obtenido sigue aumentando en tiempos posteriores alcanzando en esta ocasión un 32% a tiempos finales. Estos resultados de rendimiento sugieren de nuevo que el sustrato consumido está transformándose en un intermediario, en este caso más estable que el observado en la biotransformación de DHEA, donde finalmente acaba convirtiéndose en el producto de interés.

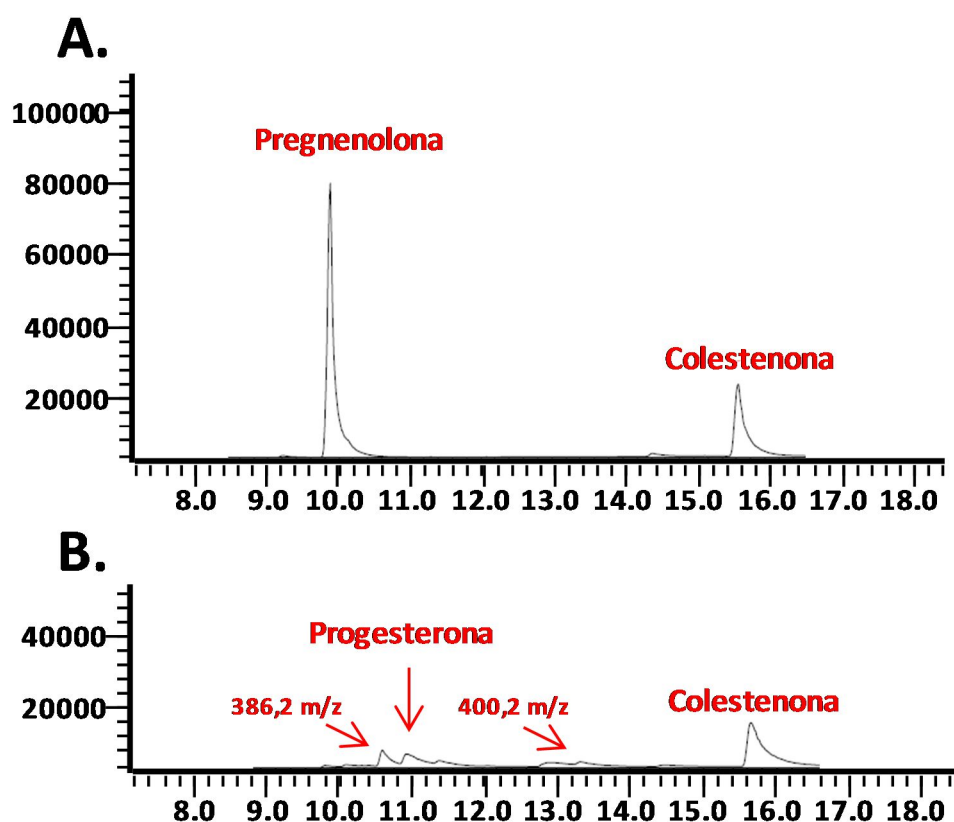


Figura 67. Análisis mediante GC-MS de las muestras procedentes de la biotransformación de la cepa *C. glutamicum* (pCGL5228) empleando pregnenolona como sustrato. **A.** Cromatograma a 0 h de reacción. **B.** Cromatograma tras 28 h de reacción. Se indican cada uno de los compuestos detectados gracias al uso de patrones así como los dos nuevos picos no identificados presentes en los tiempos finales de ensayo. La colestenoona se utilizó como patrón interno en el proceso de extracción.

El análisis del cromatograma mostró la existencia de dos picos adicionales no presentes en el tiempo inicial de reacción ni en el control negativo que no pudieron ser identificados a través de las librerías disponibles para el GC-MS. El primero de los picos, con a un tiempo de

retención de 10.65 min, presenta el ión del TMS (72.9) y un ión característico de m/z 313.3. El segundo de los picos, con un tiempo de retención de 13.34 min, presenta el ión del TMS (72.9) y un ión característico de m/z 327.3 (Tabla 14). Al contrario de lo observado en la biotransformación de DHEA a AD, ninguno de estos picos disminuye de concentración a lo largo del ensayo, lo que coincide con lo observado para el compuesto sin identificar detectado por TLC.

	T. Retención	TMS	Ión característico	m/z	m/z (pico) - m/z (Prog)
Pregnenolona	9.8 min	SÍ	388.2	315.3	-
Progesterona	10.9 min	NO	314.1	314.1	-
Pico 1	10.65 min	SÍ	386.2	313.3	-1
Pico 2	13.34 min	SÍ	400.2	327.3	13.2

Tabla 14. Características de los picos obtenidos en el análisis de GC/MS llevado a cabo con la biotransformación de DHEA en AD de la cepa *C. glutamicum* (pCGL5228). TMS se refiere a tetrametilsilano, compuesto utilizado para derivatizar las muestras y que se une a moléculas que poseen el radical –OH.

Para comprobar si los compuestos no identificados se podían considerar como parte del producto o por el contrario se trataba de contaminantes del proceso, se analizó una muestra de progesterona comercial (SIGMA, pureza <99%) por GC-MS. El espectro obtenido da lugar a un pico mayoritario con un tiempo de retención de 10.76 min y con un ión mayoritario de m/z 314 correspondiente a la progesterona. Sin embargo, también se pueden observar un pico adicional cuyo tiempo de retención y m/z corresponden a los observados en el denominado pico 1 de la biotransformación.

Estos resultados, sugieren que los compuestos adicionales hallados tanto en la biotransformación del DHEA como de la pregnenolona son probablemente compuestos tautoméricos que se pueden considerar por tanto producto de la reacción. Estos compuestos sin embargo no se están teniendo en cuenta en los cálculos de rendimiento de la biotransformación al no disponer de patrones que permitan su cuantificación.

3.2.1.1.3. Biotransformación de GP175-OL en GP175-ONA

El compuesto GP175-OL es un esteroide C_{22} con un radical –OH en la posición C_3 , y por tanto con una estructura similar a los anteriores compuestos testados en las cepas de *C. glutamicum* y la deshidrogenasa MSMEG_5228. Además es interesante destacar que se trata de un compuesto de alto valor añadido en la industria de esteroides ya que se usa como materia

prima de diversos compuestos de interés farmacológico. La producción actual de este compuesto se realiza por síntesis química, sin embargo, este tipo de procesos son altamente contaminantes y presentan inconvenientes en la purificación del producto final, por lo que la optimización de los procesos por métodos de transformación microbiana es una alternativa de interés industrial.

Una vez comprobada la capacidad de *C. glutamicum* como catalizador en biotransformaciones de compuestos esteroideos sin cadena lateral o con cadena lateral corta, procedimos a estudiar la biotransformación del compuesto GP175-OL, un compuesto intermediario obtenido de procesos de fermentación, en GP175-ONA usando la cepa recombinante *C. glutamicum* (pCGL5228).

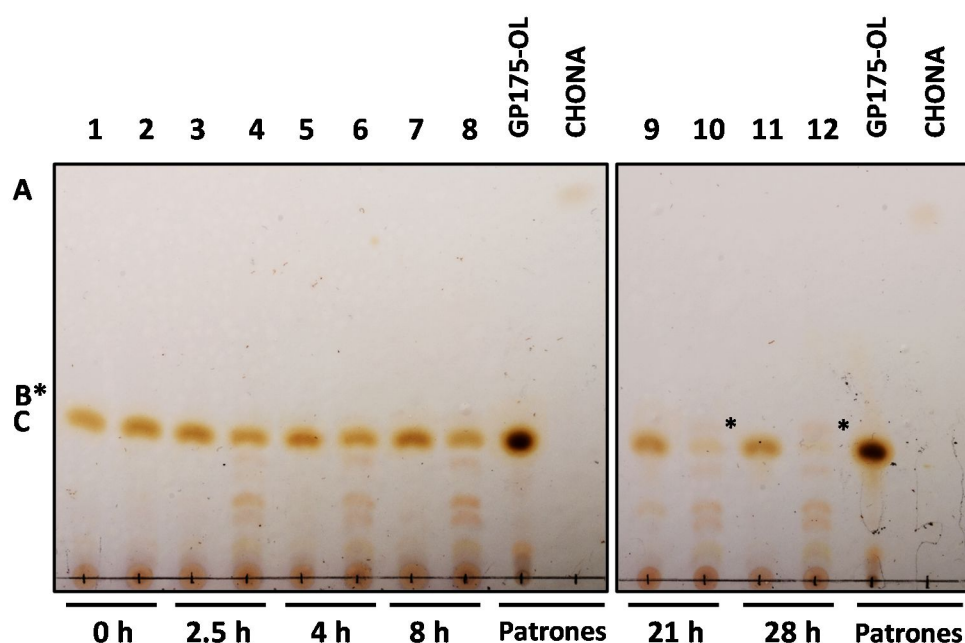


Figura 68. Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) de la biotransformación de GP175-OL en GP175-ONA. Los carriles impares corresponden a la cepa control *C. glutamicum* (pCGL0482) y los carriles pares a la cepa recombinante *C. glutamicum* (pCGL5228). Las letras indican los diferentes compuestos esteroideos presentes en la TLC: **A.** Colestenona (CHONA); **B.** GP175-ONA. Se marca con un asterisco la posición correspondiente a la banda en la TLC; **C.** GP175-OL.

Tal y como se observa en la Figura 68 y al igual que ocurría en las biotransformaciones anteriores, mientras que en la cepa con el plásmido vacío no se observa ni desaparición de sustrato ni generación de producto, en la cepa recombinante la desaparición del sustrato se comienza a observar ya en las primeras horas de ensayo. El análisis realizado por TLC también ha permitido observar la aparición de bandas adicionales no identificadas en los patrones. Teniendo en cuenta que estas bandas no están presentes en los controles realizados con la cepa

que porta el plásmido vacío, y que la intensidad de las mismas no parece variar a lo largos del tiempo, es posible que se estén produciendo compuestos derivados de la biotransformación.

Teniendo en cuenta estos resultados y para intentar determinar la concentración de producto obtenido, analizamos las extracciones por GC-MS. La conversión del sustrato consumido se pudo cuantificar tras realizar la correspondiente recta de calibrado (Figura 69).

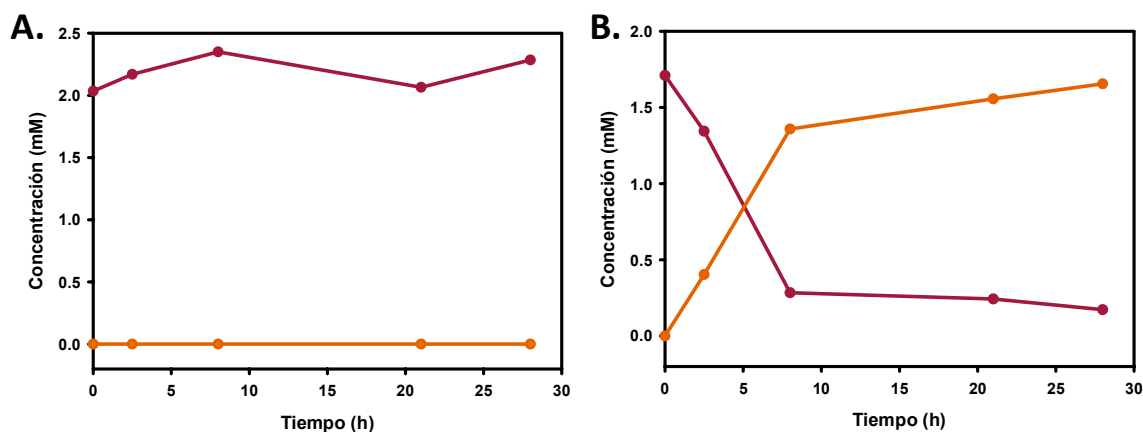


Figura 69. Biotransformación de GP175-OL (líneas granate) en GP175-ONA (líneas naranjas). A. *C. glutamicum* (pCGL0482) . B. *C. glutamicum* (pCGL5228).

A.	Conversión GP175-OL (%)	
	pCGL	pCGL5228
0 h	0	0
2.5 h	0	21.6
8 h	0	83.5
21 h	0	86.0
28 h	0	89.9

B.	ψ GP175-OL/GP175-ONA (%)	
	pCGL	pCGL5228
0 h	0	0
2.5 h	0	23.6
8 h	0	79.4
21 h	0	9.0
28 h	0	96.8

Tabla 15. Resultados obtenidos en la biotransformación de GP175-OL en GP175-ONA por las diferentes cepas de *C. glutamicum*. A. % de conversión del GP175-OL (sustrato). B. Rendimiento molar de producto obtenido respecto al sustrato consumido.

Como se puede ver en los datos representados en la Tabla 15, en este caso y pese a que la conversión del sustrato consumido no llega a alcanzar el 100% a tiempos finales de ensayo, el rendimiento de formación de producto es prácticamente del 97%. Este elevado rendimiento podría ser debido a que en este caso no se ha observado la aparición de compuestos tautoméricos adicionales que disminuyan la cuantificación del rendimiento final obtenido. La

presencia de las bandas adicionales en los análisis por TLC podría responder por tanto a compuestos minoritarios derivados de la biotransformación.

3.2.2. Clonaje del sistema de transporte Mce4 en el hospedador heterólogo *C. glutamicum* R31

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican el requerimiento absoluto del total de los 11 genes que constituyen el sistema Mce4 en Micobacterias (10 genes correspondientes al operón *mce4* y la ATPasa MceG) para el transporte de moléculas esteroideas con cadena lateral. Por otro lado, la caracterización bioquímica de la primera enzima de la ruta de la degradación del colesterol, la 3- β HSD, ha permitido conocer el rango de sustratos aceptados por esta deshidrogenasa, que incluye esteroides con diferente longitud de la cadena lateral (DHEA, pregnenolona y colesterol). Además, también se ha podido demostrar que *C. glutamicum* expresa y produce de manera activa enzimas de *M. smegmatis* y que las biotransformaciones esteroideas llevadas a cabo en este huésped, solventan problemas de rendimientos e impurezas asociados a la presencia de genes del metabolismo de esteroides. Aunque la información recopilada hasta el momento sugiere que *C. glutamicum* constituye una buena opción como chasis en biotransformaciones esteroideas, un amplio número de procesos de interés industrial parten de fitoesteroides como sustrato, por lo que se hace necesario incorporar un sistema de transporte de esteroides que posean cadena lateral.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, nos propusimos clonar el sistema Mce4 de transporte de colesterol en *C. glutamicum*. En esta estrategia de clonaje el operón *mce4* completo (genes *mce4A-mas4B*) de *M. smegmatis* cuya actividad se había comprobado anteriormente por la capacidad de complementar el mutante $\Delta mce4$ (ver apartado X.X resultados), se clonó mediante el sistema Lambda Red desde el cósmido cs6-392 que contenía el operón Mce4 completo (cedido por el laboratorio del Dr. C.M. Sassetti, University of Massachusetts Medical School, USA). Para ello el plásmido de expresión en *Corynebacterium* pEC-XK99E fue amplificado mediante PCR y posteriormente electroporado en una cepa de *E. coli* previamente transformada con el cósmido c6-392 y el plásmido pKD119 (expresión sistema Lambda Red en *E. coli*). La posterior inducción del sistema de Lambda Red en esta cepa produjo el clonaje en el plásmido pEC-XK99E del operón *mce4* al completo creando la construcción final pECmce4op (Figura 70).

Como ya se ha comentado anteriormente, el sistema Mce4 está constituido además de por los 10 genes presentes en el operón *mce4*, por la denominada ATPasa MceG, encargada de energizar el transporte de sustratos. Además y debido a la complejidad de los ensayos de transporte con sustratos radiactivos, se diseñó un ensayo mediante el uso de la 3- β HSD, que al ser una enzima dependiente de cofactor constituye un sistema indirecto de detección de transporte mediante la búsqueda del producto de la reacción (transporte relacionado con la aparición de colesteno). Por ello y en paralelo se creó también una segunda construcción en el

plásmido de expresión de *Corynebacterium* pCGL0482 (Figura 70). El gen *MSMEG_1366* (ATPasa MceG) fue amplificado por PCR con los oligos pCGLATPasa_F/pCGLATPasa_R (Tabla 4) y digerido posteriormente con las enzimas *XhoI/HpaI* mientras que el gen *MSMEG_5228* (3- β HSD) se amplificó con los oligos pCGL5228_F/pCGL5228_R y se digirió con las enzimas *HpaI/AatII*. Ambos genes se ligaron entre sí y posteriormente se subclonaron en el plásmido pCGL0482 previamente digerido con las enzimas *XhoI/AatII* generando la construcción pCGL_DA. Las construcciones pECmce4op y pCGL_DA se secuenciaron para comprobar su exactitud y posteriormente se electroporaron en la cepa *C. glutamicum* R31 generando la cepa *C. glutamicum* (pECmce4op) (pCGL_DA). Esta cepa, posee la totalidad de los genes necesarios para el transporte de colesterol (operón *mce4* y ATPasa MceG) así como el gen de la 3- β HSD para la detección indirecta de transporte.

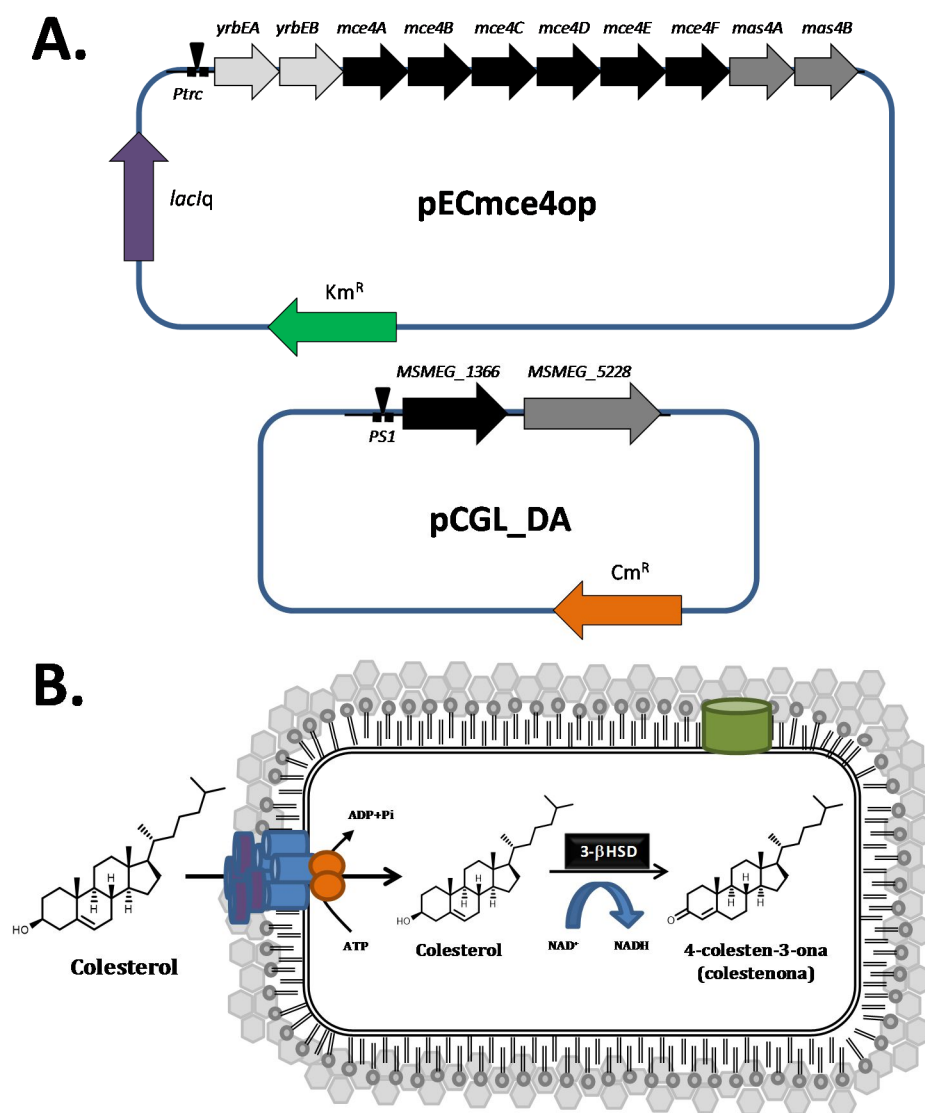


Figura 70. A. Construcción de los plásmidos pECmce4op y pCGL_DA. B. Estrategia de detección de transporte activo de colesterol en *C. glutamicum* (pECmce4op) (pCGL_DA).

3.2.2.1. Biotransformación de colesterol en colestenoa utilizando la cepa *C. glutamicum* (pECmce4op) (pCGL_DA).

Tras obtener la cepa recombinante, se realizó una primera prueba de biotransformación usando colesterol disuelto en tyloxapol al 10% como sustrato. En esta biotransformación, se probaron las cepas *C. glutamicum* (pCGL_DA), que no posee el sistema Mce4 pero sí la deshidrogenasa y por tanto constituye la cepa control de transporte pasivo y *C. glutamicum* (pECmce4op) (pCGL_DA) que incluye el sistema Mce4 completo y la deshidrogenasa, en diferentes condiciones de inducción con IPTG. La biotransformación se llevó a cabo en este caso a una densidad óptica celular superior a la utilizada anteriormente ($DO_{600} = 60$) para aumentar la sensibilidad del ensayo.

	Construcción	IPTG (mM)	Colesterol (mM)	Colestenona (mM)
0 h	DA	-	1.52	-
	pECmce4op+DA	-	1.48	-
	pECmce4op+DA	0.2	1.49	-
	pECmce4op+DA	0.1	1.47	-
2.5 h	DA	-	1.41	-
	pECmce4op+DA	-	1.48	-
	pECmce4op+DA	0.2	1.46	-
	pECmce4op+DA	0.1	1.49	-
17.5 h	DA	-	0.91	0.21
	pECmce4op+DA	-	1.05	0.19
	pECmce4op+DA	0.2	1.14	0.19
	pECmce4op+DA	0.1	0.96	0.2
26 h	DA	-	0.73	0.32
	pECmce4op+DA	-	0.91	0.28
	pECmce4op+DA	0.2	0.91	0.29
	pECmce4op+DA	1	0.92	0.3

Tabla 16. Ensayo de biotransformación de colesterol en colestenoa en las distintas construcciones de *C. glutamicum*.

Como puede observarse en los resultados obtenidos (Tabla 16) aunque a tiempos finales se producen aproximadamente 0.3 mM de colestenoa, no existen diferencias significativas entre las distintas construcciones lo que indica que el sistema de transporte Mce clonado no está siendo funcional. La aparición de pequeñas concentraciones de colestenoa a tiempos largos de biotransformación podrían deberse o bien a procesos de lisis celular o a la existencia de un transporte mediado por difusión pasiva.

Tras observar estos resultados y teniendo en cuenta la baja permeabilidad de *C. glutamicum* se intentó aumentar la concentración de IPTG utilizada para la inducción hasta 4 mM sin embargo, tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a la producción de colesteno con respecto a la cepa que no poseía el clonaje del sistema Mce4 (Figura 71). Los datos obtenidos mediante el estudio del transporte de esteroides en *M. smegmatis* mc²155, mostraron que en ausencia del transportador específico era posible observar crecimiento de las cepas cuando el colesterol aparecía en escamas, indicativo que el transporte activo probablemente es necesario especialmente cuando la concentración disponible de colesterol en el medio es relativamente baja. En este sentido y tras los primeros resultados obtenidos con la cepa de *C. glutamicum* (pECmce4op) (pCGL_DA) en los que no se observa diferencia de biotransformación con respecto a la cepa control, se intentó reproducir las mismas condiciones de cultivo realizadas en *M. smegmatis* usando elevadas concentraciones de colesterol en ausencia detergente. Sin embargo, los intentos de aumentar la concentración de colesterol hasta 10 mM mediante la adición directa en escamas al medio (sin solubilización previa con detergentes como el tyloxapol) no mostraron ningún tipo de conversión a colesteno por ninguna de las cepas, lo que sugería que la presencia de detergente que impidiese el transporte en *C. glutamicum* o la baja disponibilidad del esteroide no eran tampoco las causas de la falta de biotransformación (Figura 71).

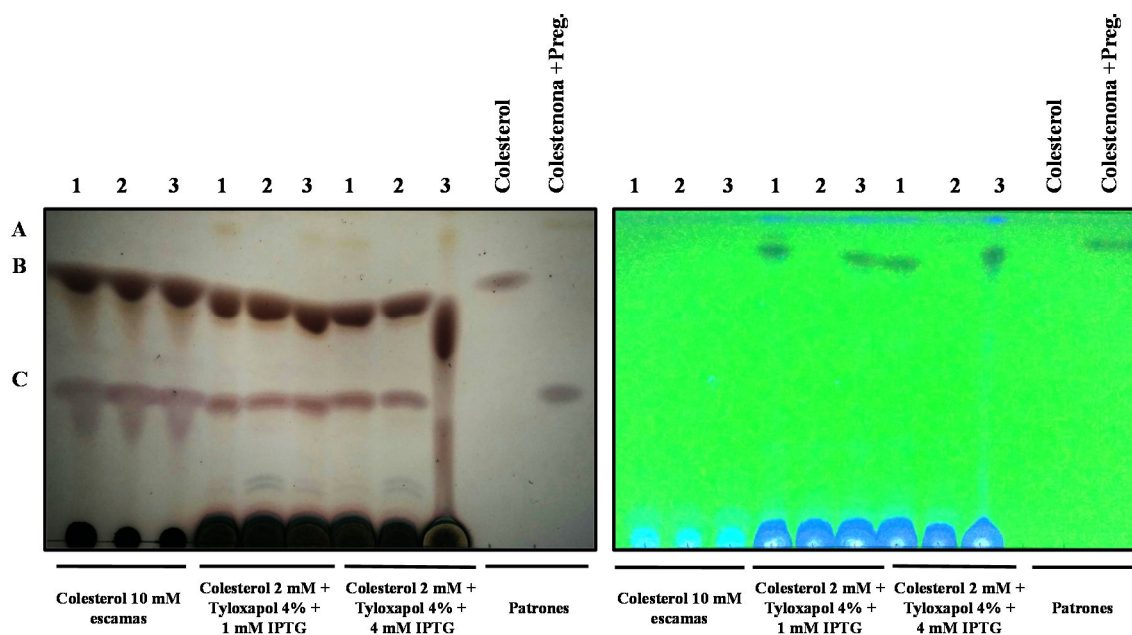


Figura 71. TLC de las diferentes biotransformación de colesterol en colestenona realizadas por las cepas de *C. glutamicum*. 1: *C. glutamicum* (pCGL_DA); 2: *C. glutamicum* (pCGL0482) (pEC-XK99E) (control plásmidos vacíos); 3: *C. glutamicum* (pCGL_DA) (pECmce4). Las letras indican los diferentes compuestos presentes en la TLC. A: Colestenona (visible a U.V.); B: Colesterol; C: Pregnenolona (Patrón interno de la extracción). En el panel de la izquierda de muestra la placa de TLC revelada con ácido sulfúrico al 20% (v/v) mientras que en el panel de la derecha se muestra la misma placa visualizada a la luz U.V.

3.2.2.2. Análisis de la expresión transcripcional del operón *mce4* en *C. glutamicum*

Ante los resultados negativos de biotransformación obtenidos con la cepa recombinante, decidimos estudiar por RT-PCR semicuantitativa la expresión de diferentes genes del operón *mce4* para intentar averiguar si la falta de actividad se debía a problemas con la expresión del operón en la cepa recombinante. Para ello, la cepa recombinante *C. glutamicum* (pCGL_DA) (pECmce4op), se cultivó en TBS hasta una fase exponencial de crecimiento ($DO_{600} = 1$) y posteriormente se indujo con IPTG 4 mM en las mismas condiciones usadas para la biotransformación. Tras 3 h de incubación con el inductor, estas células se centrifugaron para realizar la extracción de ARN y posteriormente sintetizar su correspondiente ADNc tal y como se describe en el apartado 5 de materiales y métodos. Mediante RT-PCR semicuantitativa se detectó expresión del gen *yrbE4A*. Sin embargo los genes *mce4D* (sexto gen del operón) y *mas4B* (último gen del operón) no mostraron diferencia de expresión en comparación con los respectivos controles negativos (que dan cierta presencia de banda debido a la imposibilidad de eliminar el ADN plasmídico en las muestras), lo cual sugería que no se estaban expresando adecuadamente (Figura 72 A). Para verificar que éramos capaces de ver expresión del operón nativo en *M. smegmatis*, realizamos una prueba similar con ARN de la cepa silvestre en células cultivadas en glicerol (sin inducir) y en células cultivadas en colesterol (inducidas). Los resultados muestran expresión del gen *yrbE4A* (primer gen del operón) y del gen *mas4B* (último gen del operón) en ambas condiciones de crecimiento (Figura 72 B). En conjunto estos resultados indican que la expresión de la totalidad de los genes del operón *mce4* clonado heterológamente en *C. glutamicum* no está siendo eficiente, lo que podría explicar la ausencia de transporte y por lo tanto de actividad observada en el ensayo de biotransformación.

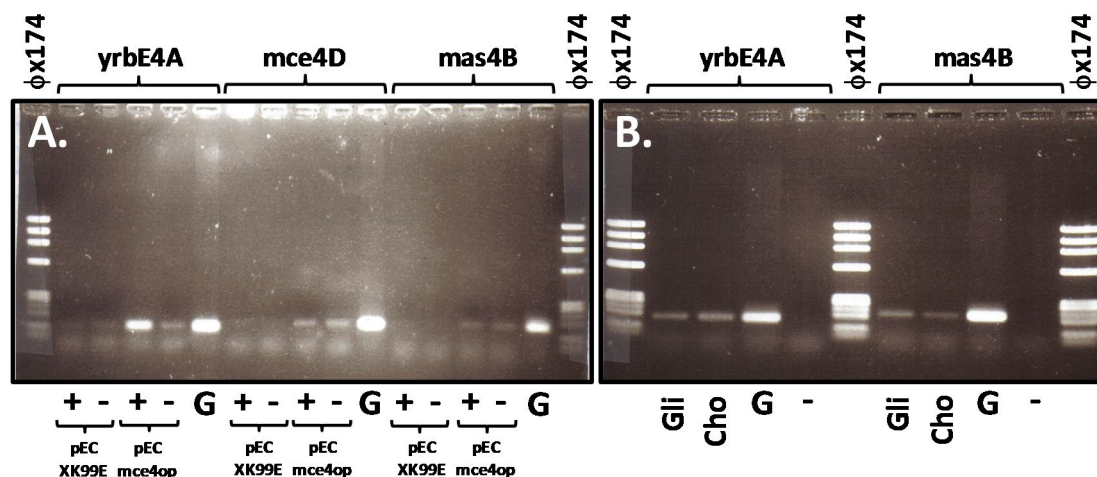


Figura 72. Análisis mediante RT-PCR de la expresión de los genes del operón *mce4*. **A.** Análisis de expresión en la cepa de *C. glutamicum* (pEC-XK99E) (plásmido vacío) y *C. glutamicum* (pECmce4op). **B.** Análisis de expresión en la cepa *M. smegmatis* mc²155. Los signos (+) indican presencia de retrotranscriptasa en la reacción; los signos (-) indican ausencia de retrotranscriptasa en la reacción; G indica la reacción llevada a cabo con ADN genómico de *M. smegmatis* mc²155 como control positivo de los oligonucleótidos; Gli se refiere a las muestras obtenidas en crecimiento en glicerol 18 mM (control de expresión basal) mientras que Cho indica muestras obtenidas en crecimiento en colesterol 1.8 mM.

VII. DISCUSIÓN

1. Identificación y caracterización del sistema de transporte activo de colesterol en *M. smegmatis* mc²155

El catabolismo bacteriano del colesterol y otros compuestos esteroideos ha adquirido una gran relevancia, no sólo debido a la importancia de estas sustancias como contaminantes ambientales (Veiga *et al.*, 2005; Gagné *et al.*, 2006), sino también debido al descubrimiento del papel fundamental que desempeña el colesterol en los procesos de infección de *M. tuberculosis* (Pandey *et al.*, 2008). Una de las etapas menos estudiadas hasta el momento en la degradación bacteriana del colesterol es el mecanismo de transporte del mismo al interior celular, proceso que hasta la fecha ha sido asociado con el sistema Mce4 en *M. tuberculosis* (Pandey *et al.*, 2008) y *R. jostii* RHAI (Mohn *et al.*, 2008).

1.1. Identificación y análisis *in silico* del operón *mce4* y la ATPasa MceG en *M. smegmatis*

El sistema Mce4 forma parte de un conjunto de complejos sistemas de transporte presentes únicamente en Actinobacterias en diferente número dependiendo del género analizado. Pese a ser identificados como sistemas ABC, estos transportadores poseen características no descritas hasta el momento en los sistemas convencionales ya que contienen hasta 10 genes de función desconocida organizados aparentemente en un único operón, lo que facilita su identificación en los diferentes organismos. Así mientras *M. tuberculosis*, la primera bacteria donde se describieron, presenta 4 operones *mce*, *R. jostii* RHAI presenta 2 y *M. smegmatis* 6. El número de operones *mce* presentes en las distintas especies de Actinobacterias parece reflejar la gran variedad de nichos ambientales habitados por estos organismos. De esta manera, las especies de *Mycobacterium* de crecimiento rápido, normalmente de suelo, poseen el mayor número de operones *mce*, siendo las especies degradadoras de compuestos aromáticos policíclicos las que poseen el mayor número de estos transportadores (Miller *et al.*, 2004). Por el contrario, las especies patógenas poseen menos operones *mce*, y *M. leprae*, un patógeno intracelular obligado, codifica un único operón *mce* completo en su genoma (Cole *et al.*, 2001). La presencia de más de un sistema Mce en la misma bacteria podría responder a redundancias funcionales de los sistemas de transporte reguladas por diferentes factores (Kumar *et al.*, 2003) sin embargo exceptuando el caso de las permeasas, el porcentaje de identidad entre genes homólogos no es suficientemente alto como para poder afirmar de manera concluyente que existan proteínas homólogas en los diferentes operones y por tanto que puedan tener funciones redundantes (Tablas 7, 8 y 9).

La comparación de secuencias con los sistemas Mce4 anteriormente descritos en *M. tuberculosis* y *R. jostii* RHAI a través de un análisis detallado del genoma de *M. smegmatis*, ha permitido la identificación del operón *MSMEG_5901-MSMEG_5893* como el sistema Mce4 en esta bacteria (Figura 35 A). Diversos estudios ponen en evidencia que los sistemas Mce4 presentes en diferentes Actinobacterias poseen una función relacionada con el transporte de

esteroides. En primer lugar, los *loci mce4* se encuentran asociados a genes relacionados con el metabolismo de esteroides en los genomas secuenciados hasta el momento. Además, cuatro de las especies que poseen *loci mce4*, es decir, *M. smegmatis* (Av-Gay *et al.*, 2000), *R. jostii*, *M. bovis* BCG (Van der Geize *et al.*, 2007) y *M. tuberculosis* (Pandey *et al.*, 2008) son capaces de crecer en colesterol y los genes *mce4* se encuentran co-regulados con los genes del metabolismo del colesterol por el represor KstR tanto en *R. jostii* RHA1 (Van der Geize *et al.*, 2007) como en *M. smegmatis* (Kendall *et al.*, 2007). El metabolismo de esteroides y el sistema de transporte Mce4 parece por tanto ser ubicuo en el género *Mycobacterium* y bastante extendido en otros géneros como *Rhodococcus* y *Nocardia*. Hay que destacar que los esteroides son compuestos muy abundantes en la naturaleza ya que se pueden encontrar en casi todos los filos, lo que los convierte en valiosos sustratos para microorganismos saprófitos, entre los que se encuentran la mayoría de las especies conocidas de actinomicetos y los antecesores de los patógenos actinomicetos actuales.

Los sistemas Mce codifican complejos sistemas de transporte activo que requieren la necesidad de una ATPasa que energice la translocación del sustrato al interior de la bacteria. Pese al gran número de genes presentes en estos operones, ninguno de ellos codifica una proteína con esta función. Basándose en mapeos de interacción génica y estudios de mutagénesis, Joshi *et al.* (2006) proporcionaron evidencia de que las proteínas Mce1 y Mce4 en *M. tuberculosis* se encontraban funcionalmente ligadas a una única ATPasa (MceG) de la familia Mkl codificada por un gen alejado de estos *loci mce*, sugiriendo por primera vez que la energización de estos sistemas de transporte se lleva a cabo por una única proteína. Posteriormente, el análisis bioinformático de las Actinobacterias que presentan *loci mce* mostró que todas ellas poseen genes codificantes de ATPasas Mkl, normalmente alejadas en el genoma de los *loci mce* (Casali *et al.*, 2007). Pese a que el proceso de transporte de colesterol en bacterias ha sido asociado al operón *mce4* en varios organismos, la ATPasa necesaria para energizar estos sistemas de transporte activo ha sido identificada hasta el momento únicamente en *M. tuberculosis* (Pandey y Sassetti, 2008). Gracias a un análisis *in silico*, hemos sido capaces de identificar el gen *MSMEG_1366*, que presenta una identidad del 79% con el ya descrito en *M. tuberculosis*, como el gen más probable codificante de la ATPasa Mkl en *M. smegmatis* mc²155.

El análisis del entorno del gen *MSMEG_1366* mostró que se encuentra en la región genómica que codifica gran parte de las proteínas ribosomales, concretamente entre los operones *rplJ/rplL* y *rpoB/rpoC*, localización que se repite en muchas de las Actinobacterias que se ha descrito que poseen operones *mce* (Tabla 5). En *E. coli*, estos dos operones pertenecen a una región formada por un *cluster* con 4 proteínas ribosomales y 2 genes de RNA polimerasa con la organización génica *rplK-rplA-rplJ-rplL-rpoB-rpoC* que constituye uno de los conjuntos de genes más conservados en Proteobacterias (Ream *et al.*, 2015). Los análisis de la distribución filogenética de la región indican que la organización génica *rpmG2-secE-nusG-rplK-rplA-rplJ-rplL-rpoB-rpoC* sería probablemente la presente en el último antecesor común a todas las

especies de Actinobacterias actuales. Esta hipótesis se basa en que estos genes se encuentran en prácticamente todos los genomas independientemente de su clasificación taxonómica y en el hecho de que una organización idéntica se observa en los genomas de los grupos más antiguos de las Actinobacterias (*Conexibacteraceae* y *Rubrobacterinea*) así como en 123 de los 219 genomas de los Firmicutes. Partiendo de esta organización génica ancestral, las reorganizaciones evolutivas sufridas por las diferentes especies de Actinobacterias indican que esta región podría constituir un punto caliente de recombinación, ya que ha sufrido numerosas ganancias y pérdidas de genes (Jamet *et al.*, 2015). Por tanto, en el caso de las Actinobacterias esta región no está tan conservada y aunque el orden de las proteínas ribosomales parece mantenerse constante, existen diferentes inserciones entre las mismas dependiendo de la especie analizada.

La idea de que la conservación evolutiva de una localización determinada en los genes pueda estar relacionada con interacciones físicas entre las proteínas codificadas por esos genes ha sido propuesta con anterioridad (Dandekar *et al.*, 1998), lo que ha llevado a ciertos autores a postular que la ATPasa Mkl podría estar implicada en procesos de transporte de ribonucleótidos (Honore *et al.*, 1993). Sin embargo, el estudio de esta ATPasa no ha asociado en ningún momento su función con las proteínas ribosomales, por lo que la diferente organización en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas de los genes ribosomales y los de las subunidades de la RNA polimerasa podrían reflejar simplemente una evolución modular de los *loci* que codifican la maquinaria transcripcional y traduccional (Eiglmeier *et al.*, 1993). La localización genómica del gen *mceG* que codifica la ATPasa-Mce en las especies del género *Mycobacterium* se encuentra siempre alejada de cualquier gen *mce*. Sin embargo, el resto de géneros analizados poseen un operón *mce* cercano a la ATPasa. Este hecho podría indicar una localización inicial de la ATPasa adyacente a los operones *mce* que posteriormente podrían haberse duplicado e integrado en diferentes regiones del genoma especializándose en diversas funciones de transporte. El motivo por el cual se ha mantenido el gen de la ATPasa entre los operones ribosomales *rplJ/rplL* y *rpoB/rpoC* es una incógnita, y aunque previamente Casali *et al.* (2007) sugirieron que esta localización podría facilitar la expresión de elevados niveles de ATPasa actualmente no hay datos que confirmen esta hipótesis, por lo que el mantenimiento del gen en esta región podría no responder simplemente a eventos de reordenación local de genes.

1.2. Análisis del operón *mce4* y del gen *mceG* como sistema de transporte de colesterol en *M. smegmatis*

Se ha descrito que los genes del operón *mce4* en *M. smegmatis* se encuentran bajo el control del represor KstR, uno de los dos reguladores que controlan la expresión de los genes implicados en el metabolismo de colesterol de Actinobacterias (Kendall *et al.*, 2007; Kendall *et al.*, 2010; García-Fernández *et al.*, 2015). El análisis de la expresión de estos genes en crecimiento en colesterol confirmó que se encuentran inducidos en presencia del esteroide,

confirmando la relación de los mismos con su metabolismo (Figura 39). La inducción relativamente moderada (1.5 veces con respecto a la expresión en presencia de glicerol) de los genes *mce4* observados por qRT-PCR en presencia de colesterol explicaría que no fuera detectada en análisis previos realizados mediante micromatrices de hibridación de DNA (Uhía *et al.*, 2012), ya que son ensayos que presentan mucha menor sensibilidad. Pese a que se ha descrito que el operón *mce4* se encuentra bajo el control del represor KstR, el análisis *in silico* de la región promotora indica que la región operadora descrita por Kendall *et al.* (2007) se encuentra muy alejada del inicio de la traducción del gen *MSMEG_5902* (Figura 35 A). El análisis realizado en esta Tesis Doctoral ha permitido identificar una segunda región operadora alejada 134 pb del inicio de la traducción del gen *MSMEG_5902*. Aunque se desconoce cuál es el sitio de inicio de la transcripción, esta segunda región operadora estaría situada entre dos posibles cajas -10 y -35 muy similares a las consenso para la unión del factor sigma SigA (homólogo a la subunidad sigma 70 de la RNA polimerasa en *E. coli*). Esta localización implica la represión de la transcripción por impedimento estérico ya que una vez unido el represor KstR impediría la unión de la RNA polimerasa. No se puede descartar tampoco el hecho de que el inicio de la traducción del gen *MSMEG_5902* se encuentre mal anotado en las bases de datos y que por tanto no corresponda al inicio real del gen. En este sentido, Rathor *et al.* (2013) describieron que el lugar de iniciación de la traducción del gen homólogo a *MSMEG_5902* en *M. tuberculosis* se encuentra 56 pares de bases aguas abajo del anotado teóricamente, por lo que harían falta estudios adicionales para saber si la región operadora KstR podría estar situada más próxima al inicio de la traducción en *M. smegmatis*. Estudios previos relativos a la expresión del operón *mce4* indicaban una inducción de los mismos bajo diversas condiciones de estrés ambiental, concretamente en presencia de estrés de membrana y de hipoxia (Rathor *et al.*, 2013). Esta observación apoyaba la idea de que la expresión del operón *mce4* aumenta considerablemente en fase estacionaria de crecimiento durante la infección de *M. tuberculosis* cuando existe una mayor estrés en la superficie celular y poca disponibilidad de oxígeno intracelular (Kumar *et al.*, 2005). Sin embargo, los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral no mostraron una inducción significativa durante la fase estacionaria de crecimiento (Figura 39), lo que podría deberse a que no se están reproduciendo las condiciones de estrés necesarias para observar dicho efecto.

Al contrario de lo observado en el operón *mce4*, el gen *MSMEG_1366* se encuentra constituyendo una única unidad de transcripción sin ningún gen regulador localizado en su entorno. Los experimentos de qRT-PCR revelaron que este gen se induce 3.5 veces en colesterol respecto a su expresión en glicerol durante la fase exponencial de crecimiento (Figura 15) y aunque su mecanismo de regulación es desconocido, el hecho de que ninguno de los otros operones *mce* presentes en *M. smegmatis* posean secuencias operadoras para KstR o KstR2 o presenten inducción en colesterol (Kendall *et al.*, 2007), significaría que la inducción del gen *mceG* observada en colesterol en estas condiciones es promovida por la demanda de complejos Mce4 recién sintetizados. Curiosamente, el análisis de la expresión génica durante la fase estacionaria temprana indicó que el gen *MSMEG_1366* muestra una mayor expresión en

glicerol con respecto a colesterol, sugiriendo que la ATPasa podría estar respondiendo en estas condiciones a las necesidades energéticas de alguno de los otros operones *mce* presentes en la célula. Esta idea concuerda con lo publicado por Kumar *et al.* (2005), quienes observaron que bajo condiciones limitantes de nutrientes como por ejemplo en fase estacionaria de crecimiento, se producía la expresión de todos los operones *mce* en *M. smegmatis*. La capacidad de la ATPasa MceG para responder de manera pleiotrópica a los requerimientos energéticos de diferentes sistemas de transporte en condiciones de estrés podría explicarse gracias al estudio de Dahl *et al.* (2003). En este trabajo, los autores observan una inducción de los genes de los operones *mce1*, *mce3* y *mce4* en el mutante Δ RelA de *M. tuberculosis* con respecto a la cepa silvestre. Estos resultados sugieren por tanto una implicación de estos sistemas en procesos relacionados con la respuesta estricta, que consiste en un complejo conjunto de cambios fisiológicos en respuesta a condiciones de estrés y escasez de nutrientes que permiten la supervivencia de la célula con un metabolismo basal. La necesidad de estos sistemas en procesos implicados con la respuesta estricta podría por tanto indicar una posible regulación pleiotrópica de la ATPasa MceG mediada por factores globales relacionados con estrés.

Los datos existentes al inicio de esta Tesis Doctoral sugerían que debido al papel crítico que juega el colesterol en la supervivencia de *M. tuberculosis* éste podría haber desarrollado mecanismos adicionales al sistema Mce4 para transportar este compuesto, ya que el mutante en el gen *mceG* es capaz de recuperar la capacidad de crecimiento en colesterol (Pandey y Sassetti, 2008). Por el contrario estudios similares realizados en *R. jostii* RHAI concluían que el transporte activo mediado por el Mce4 constituye el único sistema de transporte de este esteroide al interior celular en esta bacteria. Para estudiar el papel fisiológico de la ATPasa MceG y por tanto la necesidad de los sistemas de transporte Mce en *M. smegmatis*, en primer lugar se construyó un mutante por delección de este gen y se analizó el crecimiento de la cepa en diferentes sustratos y condiciones. Los resultados obtenidos confirman que la proteína MceG codificada por el gen *MSMEG_1366* es la única ATPasa capaz de proporcionar la energía necesaria para el transporte activo de colesterol en *M. smegmatis*, ya que en ausencia de esta enzima las bacterias no son capaces de metabolizar este esteroide incluso en presencia de fuentes de carbono adicionales (Figuras 16, 17 y 18). Por su parte los estudios de los mutantes en los diferentes genes del operón *mce4* han servido para poder llegar a varias conclusiones. En primer lugar, se ha confirmado que los genes identificados como pertenecientes al sistema Mce4 en *M. smegmatis* y al igual que se había descrito anteriormente en bacterias relacionadas (Pandey *et al.*, 2008; Mohn *et al.*, 2008) están implicados en el transporte activo de colesterol al interior celular. También se ha demostrado que las dos subunidades de las permeasas YrbE4AB no pueden ser reemplazadas por subunidades homólogas presentes en los otros operones *mce* de *M. smegmatis*, demostrando que aunque la homología entre estos genes es muy elevada (37-72%), la especificidad del sistema Mce4 por el colesterol frente al resto de sistemas Mce parece ser también muy alta. Sin embargo, la complementación en *trans* de los genes que codifican las permeasas es un proceso complicado ya que tanto en este trabajo como en el caso del estudio realizado por Monh *et al.* (2008) solo se complementó parcialmente en *trans* la delección Yrb4A.

Estos datos, sugieren que la complementación de las permeasas de manera individual no es fácil aún incluso tras su hiperproducción con un plásmido multicopia. El resto de mutaciones realizadas en los diferentes genes del operón *mce4* pueden complementarse en *trans* pero no pueden ser reemplazadas por proteínas homólogas presentes en los otros sistemas Mce. Esta observación, apoya de nuevo la idea de que la existencia de varios sistemas Mce en una misma célula no responde a redundancias funcionales sino a la necesidad de varios sistemas de transporte que respondan a diferentes sustratos o en diferentes condiciones (Figura 41).

El transporte activo de colesterol en *M. smegmatis* requiere por tanto de al menos 11 proteínas para conseguir un sistema Mce4 funcional. Estas proteínas incluyen una ATPasa (MceG), dos subunidades permeasa (YrbE4) y ocho proteínas adicionales de función de momento desconocida (Mce4ABCDEFMas4AB) aunque se ha postulado podrían codificar proteínas de unión a sustrato. En particular es interesante destacar la necesidad de los genes *mas4AB*, que aunque se encuentran ausentes en parte de los sistemas Mce identificados hasta la fecha, son esenciales en el proceso de transporte activo de colesterol en *M. smegmatis*. La necesidad de todos los genes del operón *mce4* para el transporte de colesterol fue anteriormente mencionada por Mohn *et al.* (2008) en *R. jostii* RHAI y explicaría la elevada conservación de todos los genes en los *loci mce4* de diversas Actinobacterias (Casali *et al.*, 2007). La razón por la que los sistemas Mce requieren de tantas proteínas de unión a sustrato en comparación con los transportadores ABC convencionales continúa siendo una incógnita. Trabajos previos han postulado que las proteínas Mce podrían formar un complejo con función homóloga a las proteínas de unión del sustrato de los importadores ABC convencionales y que además formara un canal que promoviera el movimiento del mismo a través de las complejas paredes celulares. Esta función coincide con la predicción bioinformática realizada por diversos autores de que las proteínas de unión a sustrato presentes en los sistemas Mce son extra citoplasmáticas y presentan motivos hidrofóbicos de anclaje a membrana (Casali *et al.*, 2007). Este papel podría recordar al propuesto para las proteínas Lsd, encargadas de transportar el grupo hemo a través de las paredes celulares de Gram-positivas a las que se encuentran ancladas (Muryoi *et al.*, 2008). Cabe destacar que los *loci mce* se encuentran casi exclusivamente en bacterias que contienen ácidos micólicos en su pared celular como los miembros de *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Nocardia*, cuyas paredes celulares son especialmente gruesas e hidrofóbicas (Sutcliffe, 1998). Además, se han identificado genes similares a los *mce* en algunas bacterias Gram-negativas (Casali *et al.*, 2007) y en plantas (García *et al.*, 2004), por lo que este amplio número de genes podría estar relacionado con el transporte a través de paredes celulares especialmente impermeables o que posean membranas externas.

Es importante destacar que la importancia de la presencia de un sistema de transporte activo de colesterol parece ser dependiente de la concentración de esteroide disponible para la bacteria en el medio. De esta manera, los crecimientos obtenidos utilizando diferentes concentraciones del detergente tyloxapol han permitido determinar que el transporte activo de colesterol mediado por el sistema Mce4 es necesario únicamente cuando la concentración

disponible del esteroide es muy baja, ya que cuando el colesterol se encuentra a niveles de saturación es capaz de transportarse por otros mecanismos (Figuras 19 y 42). El colesterol es un compuesto con una solubilidad acuosa extremadamente baja (10^{-8} M) y pese a ser ubicuo encontrándose en todas las membranas eucariotas, su concentración en forma libre en el medio ambiente debe ser muy baja. La disponibilidad de colesterol para organismos como *M. tuberculosis* es aún más crítica dado que en situaciones de infección crónica el patógeno queda retenido en el interior del fagosoma. Aunque se ha demostrado que en este estado *M. tuberculosis* tiene acceso a fuentes de colesterol (Pandey *et al.*, 2008), gran parte del mismo se encuentra embebido en la membrana plasmática que rodea al patógeno tras la fagocitosis (Gatfield *et al.*, 2000). La baja disponibilidad de colesterol en los ambientes naturales de crecimiento de las bacterias capaces de degradarlo podría por tanto justificar la necesidad de la existencia de un transporte activo del esteroide para poder metabolizarlo.

Esta observación podría explicar los resultados contradictorios obtenidos en el mutante MceG de *M. tuberculosis*, que es capaz de recuperar la capacidad de crecimiento en colesterol a tiempos largos de incubación (Pandey y Sasseti, 2008) y los obtenidos tanto en esta Tesis Doctoral en *M. smegmatis* como previamente en *R. jostii* RHAI (Mohn *et al.*, 2008) en los que se concluye que el sistema Mce4 constituye el único medio de transporte activo de colesterol al interior celular. Además, estudios recientes realizados en *M. leprae*, muestran que pese a carecer de operón *mce4* este patógeno es capaz de transportar colesterol en cantidades suficientes como para generar colesteno, reafirmando la teoría de la existencia de mecanismos adicionales de transporte de colesterol (Marques *et al.*, 2015).

Las curvas de crecimiento realizadas con los diversos mutantes en el rango de sustratos esteroideos que es capaz de metabolizar *M. smegmatis*, mostraron que al igual que lo que ocurre con el colesterol, ni el mutante de la ATPasa MceG ni los mutantes del operón *mce4* son capaces de crecer en fitosteroles como única fuente de carbono y energía. Sin embargo, sustratos con estructura diferente a la de estos esteroideos como es el caso del AD y del ADD, permitieron determinar que estos compuestos sí son capaces de transportarse libremente al interior bacteriano sin necesidad de los sistemas Mce (Figura 20). De esta manera se confirman los datos obtenidos previamente por Mohn *et al.* (2008) en *R. jostii* RHAI, quienes ya concluyeron que el sistema de transporte Mce4 únicamente está implicado en el transporte activo de compuestos esteroideos con cadena lateral larga y apolar. Sin embargo y a la vista de los resultados obtenidos con el colesterol, es importante matizar que no se puede descartar la idea de que la mayor solubilidad y por tanto biodisponibilidad del AD y el ADD sea la responsable de los resultados de crecimiento observados en los mutantes.

1.3. Implicación de los sistemas Mce en funciones de remodelación de la envoltura celular

Durante el estudio de la cepa mutante $\Delta mceG$, se observó un fenotipo de agregación mayor que la cepa silvestre en medios que no contenían detergente, indicativo de un aumento

en la hidrofobicidad de la superficie bacteriana. Esta característica fue posteriormente confirmada gracias a los ensayos en placa con Rojo Congo, un colorante que se une específicamente a los lípidos y lipoproteínas donde además de la mayor hidrofobicidad también se observó un evidente cambio de morfología en la cepa mutante *M. smegmatis* Δ 1366 (Figuras 22 y 23). La morfología de colonia, movilidad por deslizamiento, agregación en medio líquido y formación de biofilm son procesos que están influidos por el contenido lipídico de la envoltura celular en *M. smegmatis* (Etienne *et al.*, 2005). Además, los operones *mce* se habían previamente relacionado con procesos de remodelaje y/o transporte de diversos componentes de la pared celular en *M. tuberculosis* (Dunphy *et al.*, 2010; Marjanovic *et al.* 2011; Santangelo *et al.*, 2009) por lo que el hecho de observar cambios fenotípicos en el mutante Δ 1366, que inactiva la totalidad de los operones presentes en la misma bacteria, podría indicar que en *M. smegmatis* y al igual que ocurre en *M. tuberculosis*, la función de uno o varios de estos sistemas está relacionada con el transporte de componentes lipídicos presentes en la envoltura celular. Esta conclusión se corroboró mediante los estudios de las características ultraestructurales de la cepa *M. smegmatis* Δ 1366 realizados utilizando microscopía electrónica, los cuales mostraron que el grosor de la zona transparente a electrones de la envoltura celular era visiblemente mayor a la observada en la cepa silvestre (Figura 27). Efectos similares se han observado previamente en cepas mutantes de *Mycobacterium* en las que se ha sugerido que la falta de tinción observada en microscopía electrónica se debe a un cambio en la composición lipídica de esa zona de la membrana (Etienne *et al.*, 2002). Esta posible implicación de los sistemas Mce de *M. smegmatis* en procesos relacionados con modificaciones en los lípidos de la envoltura celular fue postulada previamente por Klepp *et al.* (2012) quienes a pesar de esta observación, no detectaron cambios significativos en el contenido lipídico entre la cepa silvestre *M. smegmatis* y el séxtuple mutante de los operones *mce*, que equivaldría funcionalmente al mutante Δ MceG (Klepp *et al.*, 2012).

En base a estos estudios previos no es sorprendente que la función de alguno de los sistemas Mce de *M. smegmatis* pudiera estar implicada en procesos de remodelación de la envoltura celular, sin embargo hasta la fecha el operón *mce4* ha sido exclusivamente relacionado con el transporte de colesterol en las Actinobacterias capaces de degradarlo. Es por ello por lo que uno de los efectos inesperados derivados de la inactivación de los genes del operón *mce4* fue la observación de un fenotipo similar al observado en el mutante de la ATPasa MceG, lo que sugiere que el sistema Mce4 podría jugar un papel adicional en la fisiología de *M. smegmatis* además del transporte activo de colesterol. La agregación observada en cultivo líquido sin detergente y la morfología característica de estos mutantes parece sin embargo menos patente que la observada en el mutante Δ MceG, indicando que el cambio lipídico en la envoltura celular de las diferentes cepas podría ser diferente o con distinta intensidad. Benadie *et al.* (2008) propusieron que algunos componentes de la envoltura celular son capaces de adoptar conformaciones similares a un esterol. Así, los ácidos micólicos pueden exponer su grupo hidroxilo y conferir rigidez a la estructura de la cadena para generar una topología hidrofóbica similar a la del colesterol. Aunque el cumplimiento de esta hipótesis requiere de un plegamiento muy específico, la existencia de estas conformaciones ya se ha demostrado en

análisis previos de monocapas de ácidos micólicos libres (Villeneuve *et al.*, 2005; Villeneuve *et al.*, 2007). En este sentido y sabiendo de antemano que el sistema Mce4 implicado en el transporte activo del colesterol también presenta alteraciones fenotípicas, se decidió analizar el patrón de ácidos micólicos en las cepas mutantes, que resultó ser idéntico al observado en la cepa silvestre (Figura 46).

Aunque este resultado coincide con las conclusiones de Klepp *et al.* (2012), datos previos que describen la expresión de los sistemas Mce en condiciones limitantes de nutrientes (Kumar *et al.*, 2005) o en situaciones en las que se produce la activación de la respuesta estricta (Dahl *et al.*, 2003), sugerían la necesidad de reproducir condiciones de estrés adecuadas que requieran de la función de los sistemas Mce para poder observar diferencias en el contenido lipídico de las cepas mutantes. De esta manera, nuestros resultados muestran cambios evidentes en la envuelta celular de la cepa *M. smegmatis* $\Delta 1366$ que implican modificaciones en el patrón de ácidos micólicos en condiciones de baja aeración o bajo inducción de la respuesta estricta (Figuras 25 y 26). Dado que en condiciones de cultivo normales dicho patrón no se altera, la observación de cambios en esta cepa sugiere que pueden ser debidos a la necesidad de la función de alguno de los operones *mce* en las condiciones de estrés generadas. En este sentido existen datos previos que indican que el operón *mce1* de *M. tuberculosis* podría estar implicado en el reciclaje de ácidos micólicos extracelulares para su uso como fuente de carbono (Dunphy *et al.*, 2010). Este cambio no se ha observado en el mutante específico del operón *mce4*, en el que el patrón de ácidos micólicos responde en todo momento al observado en la cepa silvestre sugiriendo que la posible función relacionada con esta clase de lípidos de membrana estaría asociada a un operón *mce* diferente.

El hecho de observar cambios fenotípicos indicaría que el sistema Mce4 podría estar relacionado con el reciclaje o transporte de componentes hidrofóbicos presentes en la envoltura celular de las micobacterias requeridos para el mantenimiento de la morfología celular. Además, la presencia de sistemas Mce únicamente en las especies de Actinobacterias, sugiere que la función de estos transportadores esté relacionada con el transporte de componentes presentes exclusivamente en las envueltas celulares de este género. Recientemente Gupta *et al.* (2015), han descrito que mutantes en los genes $\Delta relA$ y $\Delta dcpA$ de *M. smegmatis*, que tienen disminuidos los niveles de los segundos mensajeros (p)ppGpp y c-di-GMP respectivamente y que por tanto no son capaces de activar la respuesta estricta, presentan alteraciones en la formación de biofilm y las propiedades de superficie bacteriana, mostrando una morfología rugosa y elevada agregación. Estos fenotipos se correlacionaron directamente con una disminución en la cantidad de los glicopeptidolípidos (GPLs) presentes en la pared celular de los mutantes, lo que llevó a los autores a postular que (p)ppGpp y c-di-GMP podrían estar implicados en el metabolismo de GPLs y lípidos polares en *M. smegmatis*. De hecho, los mutantes de micobacterias deficientes en la producción de estos lípidos presentan alteraciones en las propiedades de superficie mostrando morfologías de colonia rugosas, menor movilidad por desplazamiento, mayor hidrofobicidad de superficie y por tanto mayor agregación en cultivos líquidos (Barrow &

Brennan, 1982; Belisle *et al.*, 1991; Recht *et al.*, 2000; Etienne *et al.*, 2002). Como ya se ha comentado, en comparación con la cepa silvestre tanto la cepa *M. smegmatis* $\Delta 1366$ como las cepas mutantes en el operón *mce4* poseen una morfología de colonia mucho más rugosa e hidrofóbica así como mayor agregación en medio líquido sin detergente, comportamientos fenotípicos idénticos a los observados en los mutantes deficientes de GPLs. Dado que estos fenotipos se vuelven especialmente evidentes en fases estacionarias de crecimiento en las que se podría estar activando la respuesta estricta, parece lógico relacionar la disminución de estos componentes de la envuelta celular en las cepas mutantes $\Delta 1366$ y $\Delta mce4$ con los cambios fenotípicos observados, lo que implicaría que la función del sistema Mce4 podría estar relacionada con el transporte de GPLs en *M. smegmatis* en condiciones de estrés. El hecho de que el sistema Mce4 pudiera poseer una función en el transporte de lípidos de la envuelta celular indica que probablemente los compuestos esteroideos son capaces de utilizar este sistema para transportarse al interior celular por su similitud de estructura con estos lípidos de membrana. En este sentido, los GPLs contienen en su estructura básica una cadena de ácido graso de una longitud de entre 26 y 32 carbonos (Hsu *et al.*, 2012), similar a los compuestos esteroideos C27 con cadena lateral como el colesterol y los fitosteroles a los que se ha determinado que es específico el transporte del sistema Mce4 (Figura 73).

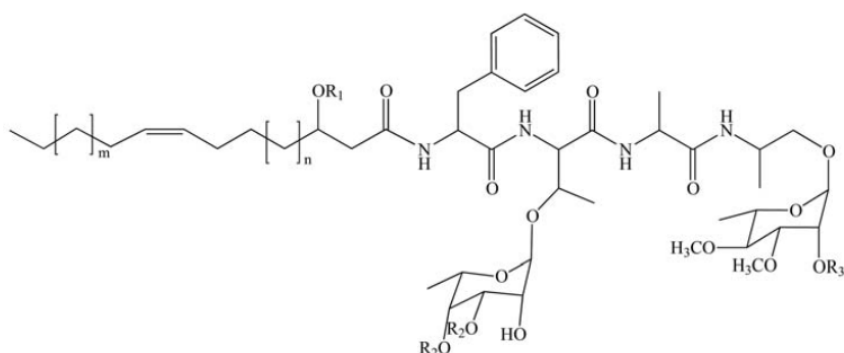


Figura 73. Estructura propuesta para los GPLs no específicos de *M. smegmatis*. R1= -H o -CH₃; R2= -H o -Ac; R3= -CH₃, -succinil, -ramnosil o -2-O-succinilramnosil; m= 12-14; n= 6-10. Figura adaptada de Daffé *et al.*, (2014).

Pese a los cambios observados en el patrón de ácidos micólicos bajo condiciones de inducción de la respuesta estricta no se puede afirmar que sean los únicos cambios existentes en la cepa $\Delta 1366$, ya que se requiere un estudio muy exhaustivo para poder analizar todos los componentes lipídicos presentes en las paredes celulares micobacterianas. Sería por tanto necesario un análisis con técnicas más sensibles y en mayor número de condiciones para poder detectar todos los cambios existentes en el contenido lipídico entre la cepa silvestre y el mutante de la ATPasa MceG.

Una explicación alternativa a los cambios fenotípicos observados en las cepas *M. smegmatis* $\Delta 1366$ y los mutantes en el operón *mce4* sería una reorganización de los lípidos de membrana debido a la falta de los complejos proteicos en la envuelta celular de la bacteria. Se ha demostrado anteriormente que la estabilidad de los transportadores bacterianos es dependiente de la presencia de las proteínas que componen el complejo (Berger and Christie 1993, Fernández *et al.* 1996). En este sentido Joshi *et al.* (2006) comprobaron que la estabilidad de la proteína MceG depende de la expresión de las proteínas del complejo MceI en *M. smegmatis*. En una ampliación de este estudio se demostró que en ausencia de ATPasa o en presencia de un mutante puntual de la misma (K66N) incapaz de unir ATP (Henriksen *et al.*, 2005), no se detecta la presencia de proteínas MceI. Dado que la transcripción de los genes *mce* no se ve afectada en los mutantes en la proteína MceG (C.M. Sassetti, comunicación personal), la estabilidad de las proteínas MceI parece ser dependiente no solo de la presencia de ATPasa MceG sino de la presencia de una copia funcional de la misma (Tesis Doctoral Griffin J.E., 2011). De acuerdo con estos datos, los mutantes del operón *mce4* carecerían de todo el complejo mostrando cierta alteración en la membrana mientras que los mutantes en la ATPasa MceG desestabilizarían todos los sistemas Mce presentes en la célula mostrando por tanto una alteración de superficie mucho mayor.

La probable implicación de los sistemas Mce en procesos de remodelación de la pared celular, sugiere que estos transportadores puedan estar localizados en puntos específicos de la membrana de la bacteria donde sean necesarios dichos cambios. En este sentido, los estudios de localización de la ATPasa MceG indican que los operones *mce* no se encuentran homogéneamente distribuidos a lo largo de la pared celular micobacteriana, sino que poseen una localización específica en puntos definidos (Figura 28). Aunque el patrón de fluorescencia obtenido podría deberse a la formación de cuerpos de inclusión, cabe destacar que este fenómeno se limita principalmente a procesos de sobreproducción de proteínas y que además, las proteínas presentes en cuerpos de inclusión suelen ser inactivas y por tanto no presentar fluorescencia o presentar patrones que difieren bastante de los obtenidos con la ATPasa MceG (Huang *et al.*, 2013). Además, el análisis mediante *Western blot* del extracto proteico de la cepa $\Delta 1366$ + MEKATPasaFL que posee la copia nativa de la ATPasa, mostró que la gran mayoría de la misma se encuentra en forma soluble (datos no mostrados) descartando la posibilidad de que el patrón de fluorescencia observada se deba a proteínas presentes en cuerpos de inclusión.

1.4. Estudio de la región C-terminal de la ATPasa MceG y su implicación en el transporte de colesterol en *M. smegmatis*.

El análisis *in silico* de la ATPasa MceG reveló que además de las secuencias típicas de las ATPasas de los sistemas ABC, esta proteína posee una región C-terminal más extensa de lo habitual que se encuentra conservada en las ATPasas asociadas a sistemas Mce pero que sin embargo no está presente en la mayoría de ATPasas cristalizadas hasta el momento. Se han

descrito extensiones de los dominios C-terminal similares al observado en la proteína MceG en otros transportadores ABC observándose que cumplen principalmente funciones regulatorias a través de su interacción con factores de transcripción (Joly *et al.*, 2004; Richet *et al.*, 2005) o bien se unen con sustancias que inhiben el transportador de manera reversible (Gerber *et al.*, 2008). Para estudiar el posible papel fisiológico de la extensión C-terminal de la ATPasa MceG se construyeron diferentes versiones truncadas de la misma que fueron utilizadas para intentar complementar la cepa $\Delta 1366$ durante el crecimiento en colesterol. Exceptuando la cepa $\Delta 1366 + \text{MEK_ATPasa322}$, cuyo crecimiento en colesterol fue idéntico al de la cepa complementada con la versión silvestre de la proteína, el resto de versiones presentan una fase de latencia que fue proporcional al tamaño de la proteína truncada (Figura 32), sugiriendo una implicación del dominio C-terminal de la proteína en el proceso de transporte de colesterol. Curiosamente, la cepa $\Delta 1366 + \text{MEK_ATPasa322}$ tiene una delección de los últimos 38 aminoácidos de la proteína, que constituyen la región con menor homología entre las diferentes ATPasas MceG descritas hasta el momento. El hecho de que sea ésta la única versión truncada que no presenta diferencias de complementación con la versión nativa de la proteína podría indicar que la región delecionada no es necesaria para la correcta función de la ATPasa en el proceso de transporte de colesterol.

La implicación de la región C-terminal de las ATPasas de los sistemas de transporte ABC en procesos regulatorios se ha descrito principalmente en el transportador de la maltosa (operón *mal*) de *E. coli*. En este caso la ATPasa del sistema (proteína MalK) se encuentra unida a un activador transcripcional (proteína MalT) a través de la región C-terminal hasta que se produce la hidrólisis del ATP, momento en el que se libera el activador permitiendo la inducción de los genes del operón *mal*. La relación entre la regulación del operón *mal* y el dominio C-terminal de la ATPasa MalK del sistema de transporte de la maltosa se detectó al observar que en *E. coli*, los mutantes ΔMalK expresaban de manera constitutiva los genes *mal* (M. Schwartz, Thesis, Doctorat es Sciences, Université de Paris, Paris, France). El análisis de la expresión del operón *mce4* en el mutante $\Delta 1366$ de *M. smegmatis* reveló que los genes del mismo se expresan de manera equiparable a la cepa silvestre en condiciones de no inducción (Figura 74), lo que indica que la falta de la ATPasa no altera los niveles de los genes *mce4* al menos a nivel transcripcional. Además, la sobreproducción de la ATPasa MceG en *M. smegmatis* conseguida mediante la construcción de la cepa *M. smegmatis* (pMV1366) no produce efecto alguno en el crecimiento en colesterol (datos no mostrados) lo que difiere de los resultados obtenidos en el operón *mal* de *E. coli*, en el que se observó que la sobreproducción de la ATPasa MalK inhibía el transporte de la maltosa (Reyes *et al.*, 1988).

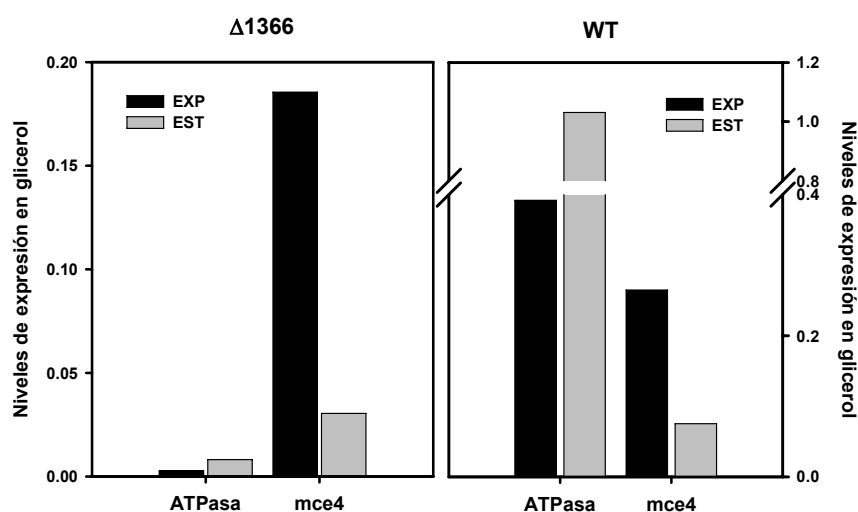


Figura 74. Análisis de la expresión de los genes *MSMEG_1366* (ATPase MceG) y *MSMEG_5900* (*mce4A*) en la cepa mutante *M. smegmatis* $\Delta 1366$ y en la cepa silvestre *M. smegmatis* cultivadas en medio mínimo con glicerol 18 mM.

Los resultados del análisis del crecimiento en colesterol de las cepas complementadas con las versiones truncadas del dominio C-terminal de la ATPase MceG mostraron un claro efecto sobre el crecimiento en colesterol con una fase de latencia proporcional al fragmento delecionado. De esta manera y aunque se retarda el crecimiento en colesterol, todas las versiones son capaces crecer en el esteroide (Figura 32). Estos resultados también difieren con los obtenidos en el caso del operón *mal* de *E. coli*, donde la eliminación completa de la extensión C-terminal en MalK conduce a la pérdida total de transporte de maltosa aun dejando intactos todos los motivos considerados esenciales en una ATPase ABC, sugiriendo que la región C-terminal probablemente esté implicada en el ciclo de transporte además de poseer funciones reguladoras (Boos *et al.*, 2000; Böhm *et al.*, 2004). El conjunto de estos datos indican que la función del dominio C-terminal de la ATPase MceG de *M. smegmatis* no está implicada en procesos de regulación de la transcripción del sistema Mce4 similares a los ya descritos en el sistema de transporte de la maltosa de *E. coli*.

El segundo mecanismo regulatorio relacionado con regiones C-terminal de las ATPasas ABC se asocia a procesos de trans-inhibición, en el que los sustratos ejercen un efecto inhibitorio en el transportador proporcional a su concentración una vez que la translocación del mismo ha tenido lugar (Pall *et al.*, 1971). Este tipo de inhibición ha sido descrito en el sistema de transporte de molibdato/tungstato de la bacteria *Methanosarcina acetivorans*, donde los autores demuestran que la mutación de los dominios esenciales de unión a molibdato, que se encuentran en la región C-terminal de la ATPase, producen la pérdida de la inhibición por

sustrato en el transporte (Deves *et al.*, 1998; Gerber *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos con las versiones truncadas de la ATPasa MceG muestran mayor fase de latencia cuando mayor es la zona truncada, por lo que no parece probable que una elevada concentración de colesterol esté inhibiendo el transporte al unirse a la región C-terminal.

Una vez descartada la implicación del dominio C-terminal de la ATPasa MceG en procesos regulatorios similares a los ya descritos para otras ATPasas, una posible explicación para la diferente capacidad de las construcciones truncadas de complementar el mutante $\Delta 1366$ podría ser el hecho que las proteínas mutadas se encuentren en diferentes niveles en las células. Sin embargo, el análisis de los niveles de producción de las diferentes construcciones mediante Western Blot confirmó que todas ellas se expresan de manera equivalente (Figura 33) por lo que el diferente fenotipo observado no es atribuible a la inestabilidad de las proteínas truncadas. Así mismo, también se determinó mediante *Western blot* que el crecimiento de las cepas complementadas con las versiones truncadas de la ATPasa no es debido a una sobreproducción de la proteína como mecanismo compensatorio ante la presencia de una proteína con menor actividad (datos no mostrados).

Otra posible función del dominio C-terminal de la ATPasa es la implicación en la unión a la permeasa del sistema. De ser así, la delección del mismo haría más débil la unión de la ATPasa al resto del sistema de transporte explicando las largas fases de latencia en crecimiento en colesterol de las versiones truncadas. Sin embargo la comparación de los distintos experimentos de localización de las ATPasas mediante técnicas de fluorescencia (Figura 34), muestra que la versión truncada presenta una localización similar a la observada en la ATPasa nativa. Sin embargo, y aunque puede observarse que la ATPasa258 se encuentra unida a membrana y no en el citoplasma, no se puede asegurar a través de estos estudios de localización si se encuentra unida a la totalidad de los operones *mce* o no, por lo que no es posible determinar si la región C-terminal podría estar implicada en la unión específica a un sistema Mce en particular.

Tras descartar funciones reguladoras, de estabilización estructural y de unión al transportador, el conjunto de resultados obtenidos en el estudio del dominio C-terminal de la ATPasa MceG sugieren que esta región podría estar implicada en funciones adicionales no descritas hasta el momento. Este hecho, unido a estudios recientes que sugieren que proteínas adicionales como la bomba de flujo P55 podrían estar implicadas de alguna manera en el proceso de transporte de colesterol (Ramón-García *et al.*, 2015), sugieren una interacción de la ATPasa MceG con sistemas adicionales a los Mce. De esta manera, la región C-terminal de la ATPasa MceG podría estar implicada en la unión a otra proteína adicional al sistema descrito hasta el momento.

1.5. Estudio de la región EExDA de las proteínas YrbE4 y su implicación en el transporte de colesterol en *M. smegmatis*.

Aunque las permeasas YrbE4 constituyen los componentes más conservados de los sistemas Mce, presentan un motivo diferencial significativo ya que contienen una secuencia EExDA en lugar de la secuencia EAA, cuya implicación en la unión de la ATPasa al transportador en los sistemas ABC convencionales es conocida. Los estudios de mutagénesis dirigida realizados sobre los dos dominios EExDA presentes en las permeasas YrbE4, mostraron que se trata de una secuencia esencial para el correcto funcionamiento del transportador Mce4 (Figura 48), explicando el alto grado de conservación del mismo entre las Actinobacterias. Esta observación, coincide con los estudios realizados sobre el bucle EAA de las proteínas MalF/MalG (transportador de la maltosa) donde se observó que ninguno de los dobles mutantes, es decir, aquellos que poseían modificaciones en el bucle EAA de ambas permeasas, eran capaces de llevar a cabo la función de transporte (Mourez *et al.*, 1997).

Estudios anteriores realizados por los mismos autores (Mourez *et al.*, 1997), mostraron que de todas las probadas, únicamente dos sustituciones en la región EAA de la permeasa MalG eran capaces de suprimir completamente el transporte de maltosa, sin embargo, cambios idénticos realizados en la proteína MalF no tuvieron un efecto significativo. Este resultado sugirió por primera vez que las regiones EAA, y probablemente las permeasas MalG y MalF, no funcionaban de manera simétrica pese a que hasta entonces generalmente se asumía que estas proteínas jugaban un papel similar (Shuman y Panagiotidis, 1993). Los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral, muestran que las mutaciones individuales de los dominios EExDA presentan un fenotipo idéntico de crecimiento en colesterol, indicando que la integridad de la secuencia EExDA de ambas permeasas es esencial para el correcto funcionamiento del transportador Mce4. Es interesante destacar que los estudios fenotípicos realizados con estas cepas mutantes mostraron un fenotipo idéntico al del resto de mutantes del operón *mce4*, indicativo de una falta de funcionalidad del transportador Mce4 también en sus funciones de remodelación de componentes de la envuelta celular (Figuras 50 y 51).

2. Aplicaciones biotecnológicas

2.1. Caracterización de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) que cataliza el primer paso de degradación de colesterol en *M. smegmatis* mc²155

Aunque la capacidad del género *Mycobacteria* para degradar colesterol fue descrita hace años, las reacciones implicadas en las primeras etapas de la ruta siguen sin estar completamente caracterizadas. En general, se sabe que el primer paso en el catabolismo bacteriano del colesterol consiste en la oxidación del mismo a colest-5-en-3-ona y su posterior isomerización a colest-4-en-3-ona (colestenona), transformación que puede ser catalizada por

enzimas de tipo colesterol oxidasa o por las denominadas 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas. Así, Horinouchi *et al.* (1991) describieron por primera vez una colesterol deshidrogenasa NAD(P)-dependiente en *Nocardia sp.* responsable de esta transformación. Años más tarde, la completa caracterización bioquímica de una 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en *M. tuberculosis* (Yang *et al.*, 2007) permitió entre otras cosas identificar el rango de sustratos de la enzima y la existencia de posibles inhibidores, información que podría posibilitar el bloqueo de esta ruta que el patógeno usa durante la fase de infección crónica. Posteriormente y gracias a un análisis de similitud por comparación de secuencias, se demostró que el primer paso en el catabolismo del colesterol en *M. smegmatis* mc²155 es llevado a cabo principalmente por la enzima MSMEG_5228, una 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa perteneciente a la superfamilia de las deshidrogenasas / reductasas de cadena corta (SDR) (Uhía *et al.*, 2011b), que presenta una identidad del 77% con la proteína de *Nocardia*. En el caso de *M. smegmatis* mc²155 y pese a la confirmación de la función que posee el gen MSMEG_5228 dentro de la ruta de degradación del colesterol, la falta de un sistema optimizado de expresión de proteínas había imposibilitado hasta el momento la completa caracterización bioquímica de la enzima..

Las enzimas denominadas SDR (Short chain dehydrogenase/reductase) forman una gran familia de proteínas cuyas estructuras tridimensionales presentan un patrón de plegamiento α/β similar denominado motivo Rossmann que se encuentra conservado entre los dominios de unión a NAD(P) de muchas deshidrogenasas NAD(P)-dependientes (Scrutton, 1990). El modelado de la enzima 3 β HSD muestra que presenta los dominios característicos de proteínas de la superfamilia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR) (Oppermann *et al.*, 2003). Sin embargo, debido a la heterogeneidad funcional de este grupo el motivo de unión del sustrato es por el contrario muy variable, y pese a que la molécula de colesterol encaja en la estructura del modelo propuesto (Figuras 53 y 54)) no es posible afirmar que el modelo para esta zona sea totalmente fiable.

La caracterización bioquímica de la proteína MSMEG_5228 reveló una absoluta especificidad por el cofactor NAD⁺ frente al NADP, por lo que la región que comprende los aminoácidos 46-50 probablemente se posicione de manera más central, con la arginina (R40), la valina (V41) y la fenilalanina (F42) creando un bolsillo idóneo para la correcta estabilización del NAD⁺ (Figura 75 A). Las características bioquímicas del sustrato sugieren también que la otra zona modelada con un bajo grado de confianza, i.e., la zona perteneciente a los aminoácidos 280-309, podría actuar como una especie de tapadera móvil proporcionando el ambiente altamente hidrófobo necesario para interactuar con la molécula de colesterol (Figura 75 B).

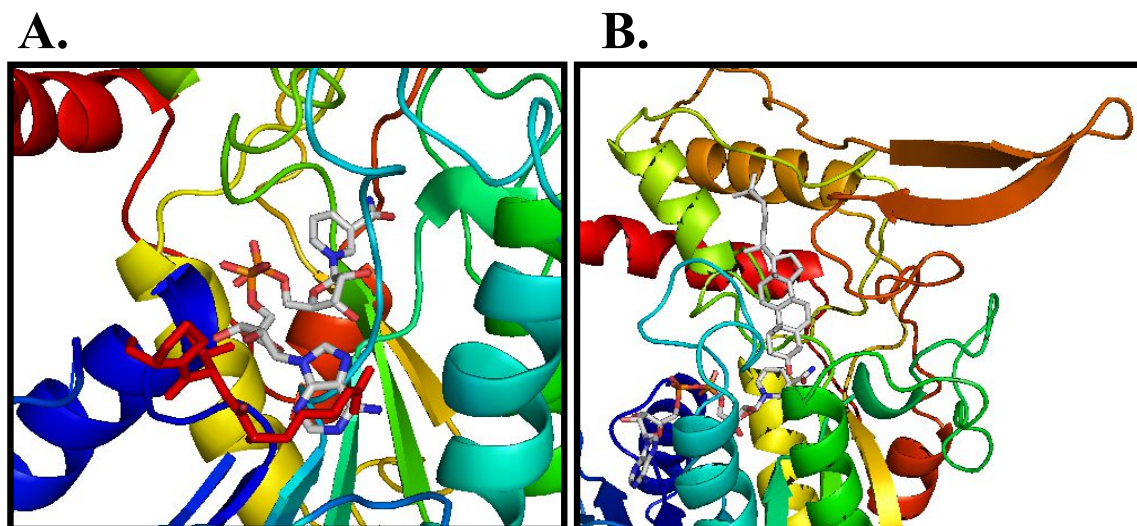


Figura 75. Análisis del sitio de unión a colesterol en la enzima MSMEG_5228. **A.** Se muestran en color rojo los aminoácidos que estarían implicados en la estabilización del NAD⁺ (R40, V41 y F42). **B.** La molécula de colesterol situada en la estructura se encuentra expuesta al ambiente acuoso, sugiriendo que la región 280-309 podría actuar como tapadera móvil proporcionando el ambiente hidrófobo necesario para esta molécula.

La proteína MSMEG_5228 es muy similar a nivel de secuencia a las 3 β HSD ya descritas de *Nocardia* sp. y *M. tuberculosis* (Horinouchi *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 2007), sin embargo, el modelado de la misma indica que la similitud de secuencia no necesariamente implica una similitud estructural y por tanto, podría diferir en cuanto a sus características bioquímicas. Los intentos de obtener proteína activa en *E. coli* fueron infructuosos por la aparición de problemas de insolubilidad y de artefactos en la medida de la actividad debidos probablemente a las condiciones microaerófilas (baja agitación) de cultivo que hacen que se sobreproduzcan las alcohol deshidrogenasas (Chen *et al.*, 1991; Membrillo-Hernández *et al.*, 2000). Sin embargo, la expresión de la proteína en el sistema pTIPQC1 de *R. erythropolis* IGTS8, un microorganismo filogenéticamente más relacionado con *M. smegmatis*, permitió llegar a obtener niveles importantes de proteína soluble y activa. Gracias a esto se consiguió determinar la actividad enzimática mediante ensayos espectrofotométricos y poder realizar una caracterización bioquímica de la proteína MSMEG_5228 en la cual se determinó además de su cofactor, la especificidad de sustratos, dependencia catiónica y la influencia de diversos factores sobre su actividad. Por último, el estudio fenotípico de la cepa de *R. erythropolis* (pTip5228) que hiperproduce la proteína MSMEG_5228 no mostró diferencias notables en el crecimiento en colesterol como única fuente de carbono y energía con respecto a la cepa silvestre (datos no mostrados), corroborando datos previos en los que ya se sugería que la transformación del colesterol en colesteno no constituye la etapa limitante del catabolismo del esteroide (Uhía *et al.*, 2011b).

2.2. Uso industrial de *C. glutamicum* como hospedador heterólogo en biotransformaciones esteroideas de interés.

Los esfuerzos que se están realizando actualmente en el campo de la producción de esteroides están orientados tanto al descubrimiento de nuevos compuestos, como hacia el aislamiento de microorganismos capaces de realizar las necesarias transformaciones de estos esteroides. En este sentido, los trabajos se están enfocando principalmente hacia la mejora de la actividad de biotransformación de esteroides en las cepas industriales en uso; hacia la manipulación de las rutas metabólicas de esteroides mediante ingeniería genética de los biocatalizadores, y hacia una mayor comprensión de los mecanismos de transporte de esteroides a través de las membranas de los biocatalizadores. *Mycobacterium* constituye actualmente el género más comúnmente utilizado en la producción industrial de esteroides, sin embargo y pese al creciente conocimiento que existe sobre la ruta de degradación del colesterol en este organismo con el fin de mejorar su potencial, su utilización presenta diversos inconvenientes que se han puesto de manifiesto en los últimos años. En primer lugar, la presencia de la ruta endógena de degradación de colesterol en estas bacterias hace necesaria la creación de mutantes específicos mediante técnicas moleculares para permitir la acumulación del intermediario de interés. En segundo lugar, estos microorganismos presentan actividades enzimáticas que aunque no forman parte de la ruta son capaces de modificar los compuestos acumulados disminuyendo el rendimiento del producto de interés y/o dificultando su purificación en los procesos industriales. Estos inconvenientes, han incentivado la búsqueda de organismos heterólogos alternativos para la producción industrial de compuestos esteroideos de interés industrial.

Los experimentos que demuestran la mayor permeabilidad a esteroides de las células de *E. coli* mutantes en *tolC* frente a las células salvajes (Fujii *et al.*, 2009) apuntan la posibilidad de que otras mutaciones que puedan afectar la permeabilidad de la célula a sustancias hidrofóbicas sean capaces de proporcionar una mayor permeabilidad a los esteroides. En este sentido, las mutaciones en *tolC*, junto con otras mutaciones, afectan la permeabilidad de la membrana y aumentan la sensibilidad de *E. coli* a los antibióticos hidrofóbicos (Hancock *et al.*, 1984; Fralick *et al.*, 1994; Koronakis *et al.*, 2004; Elkins and Mullis, 2006; Delcour, 2009; Hearn *et al.*, 2009). Por lo tanto, es probable que estas mutaciones incrementen la permeabilidad a los esteroides. Existen algunos trabajos en los que se ha estudiado concretamente la manera de mejorar el transporte de esteroides en bacterias Gram-negativas como *Salmonella* o *Pseudomonas* mediante la perturbación en la composición del lipopolisacárido de la envoltura o la producción de alguna porina (Plesiat *et al.*, 1997). Sin embargo, los datos existentes no parecen demostrar una mejora del transporte de esteroides a través de este tipo de estrategias. Además, la expresión heteróloga de enzimas de *Mycobacterium* en *E. coli* u otros organismos Gram-negativos suele presentar problemas como los observados para la enzima 3 β -HSD estudiada en esta Tesis Doctoral. Por tanto, uno de los principales cuellos de botella para la biotransformación de esteroides utilizando microorganismos heterólogos es el transporte de los esteroides al interior de

la bacteria, proceso que parece exclusivo de los microorganismos capaces de metabolizarlo, con los consiguientes inconvenientes anteriormente citados. De hecho todos los microorganismos que poseen el sistema Mce4, el único transportador de colesterol bacteriano identificado hasta el momento, tienen también la capacidad de metabolizar el mismo, indicando la necesidad de clonar el transportador en un hospedador heterólogo.

La particularidad y complejidad del transportador Mce4, requiere la búsqueda de un organismo heterólogo con una pared celular similar a la de *Mycobacterias* para facilitar la correcta localización del complejo. En este sentido, el género *Corynebacterium* se ha utilizado extensamente en la industria, y posee una serie de características que le convierten en el mejor candidato como hospedador heterólogo del metabolismo esteroideo. En concreto, la cepa más estudiada es *C. glutamicum* cuyo genoma se encuentra secuenciado y es una de las pocas Actinobacterias que carecen de sistemas Mce. La utilización de *C. glutamicum* en la producción de compuestos esteroideos no es nueva (Sonomoto *et al.*, 1983; Datcheva *et al.*, 1986), sin embargo, el escaso conocimiento existente hasta la fecha acerca del transporte y metabolismo de estos compuestos ha limitado su potencial como hospedador heterólogo en este tipo de procesos. En este sentido, la producción heteróloga de la 3 β HSD de *M. smegmatis* en *C. glutamicum* ha demostrado no solo que las enzimas del metabolismo de esteroides de *M. smegmatis* pueden ser funcionales en este microorganismo sino también que los compuestos esteroideos sin cadena lateral como el DHEA son capaces de transportarse al interior de la bacteria sin necesidad de un transportador específico. Además, el conocimiento del rango de sustratos de la enzima 3 β -HSD, nos ha permitido comprobar que otros compuestos esteroideos con una cadena lateral corta como la pregnenolona, tampoco requieren de un transportador específico, confirmando los datos obtenidos previamente por Mohn *et al.* (2008). En este trabajo se ha utilizado la cepa recombinante *C. glutamicum* (DA) para abordar la biotransformación de distintos tipos de compuestos esteroideos. Se han obtenido rendimientos cercanos al 70% utilizando como sustrato el AD y del 32% para la progesterona (Tablas 11 y 13 respectivamente). El hecho de no obtener el 100 % de rendimiento se explicó al optimizar las condiciones de ruptura en la extracción, lo que mostró la aparición de productos adicionales a los esperados. Estos productos no son derivados de la acción de enzimas endógenas ni sobre el sustrato ni sobre el producto de la reacción (datos mostrados), ya parecen ser compuestos tautoméricos de los esteroides que aparecen ocasionalmente y cuya formación no se detecta en organismos que son capaces de degradarlos. Estos compuestos tautoméricos podrían ser generados por las condiciones de ensayo y no se contabilizaron en los cálculos de rendimiento. Podemos suponer que estos compuestos son productos generados por la acción de la 3 β -HSD por lo que en caso de ser contabilizados el rendimiento obtenido aumentaría notablemente al igual que el potencial biotecnológico de *C. glutamicum* como chasis para producciones industriales de esteroides.

A pesar de la gran potencialidad de este microorganismo, el interés de gran parte de las producciones industriales de esteroides actualmente implica el uso de fitosteroles como sustrato de partida debido a su bajo coste. El estudio del transporte del colesterol en *M. smegmatis* realizado en esta Tesis Doctoral ha permitido determinar que el transporte de este tipo de compuestos requiere del sistema Mce4 y ha definido el sistema mínimo necesario para conseguir un transporte activo. El conjunto de estos datos, junto con la necesidad de búsqueda de un microorganismo heterólogo para la producción de sintonas de interés industrial, nos llevó a clonar el operon *mce4* completo junto con la ATPasa y la 3 β -HSD como sistema indirecto de detección de transporte en *C. glutamicum*. Las primeras pruebas realizadas con este clon han mostrado cierta aparición de colesteno a tiempos largos de incubación, sin embargo, los niveles de colesteno obtenidos han sido idénticos a los de la cepa control (Tabla 16). Como ya se ha comentado, en *M. smegmatis* en condiciones saturantes de esteroide se observa crecimiento de las cepas mutantes del transportador Mce4, indicativo de que existe cierto transporte independiente a este sistema. Sin embargo en *C. glutamicum* el transporte no es muy evidente teniendo en cuenta la baja conversión obtenida en las condiciones del ensayo donde existe una gran cantidad de células (D.O. de 60). En este sentido, conviene destacar que las envolturas celulares de Micobacterias difieren de las de Corinebacterias especialmente en el área de membrana intermedia, compuesta en su mayoría por peptidoglicano, siendo más gruesa en estas últimas (Figura 76 A). Además, existe una mayor hidrofobicidad de superficie de las cepas de *Mycobacterium* con respecto a las de *Corinebacterium* debido a la diferente longitud de los ácidos micólicos presentes en sus envolturas celulares (Figura 76 B) que podría suponer una mayor adhesión del colesterol a la superficie celular favoreciendo el transporte del mismo.

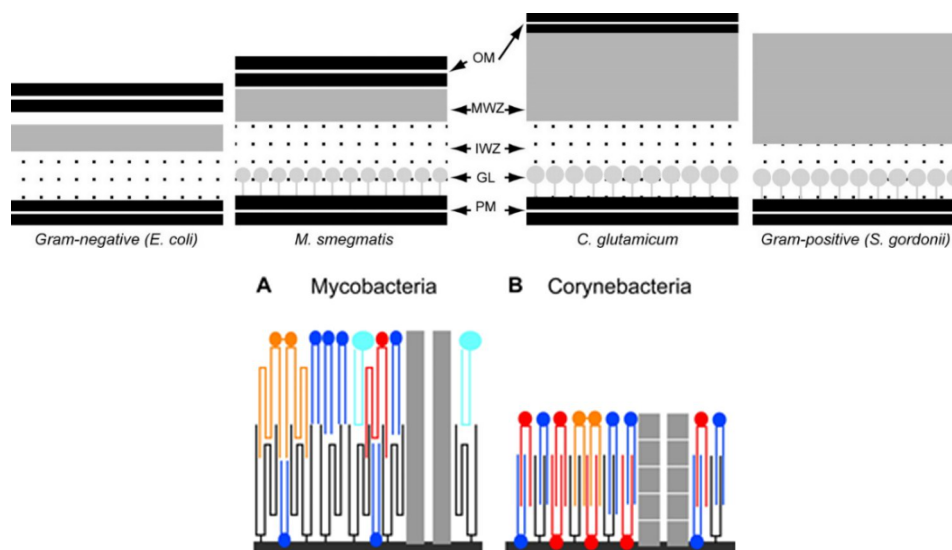


Figura 76. A. Esquemas de las estructuras de las envolturas celulares características de bacterias Gram-negativas, *M. smegmatis*, *C. glutamicum* y bacterias Gram-positivas. OM (outer membrane), membrana externa; MWZ (medial wall zone), área de membrana intermedia; IWZ (inner wall zone), área de membrana interna; GL (granular layer), capa granular; PM (plasma membrane), membrana plasmática. B. Esquema representativo de la membrana externa presente en Mycobacteria y Corynebacteria. Imágenes adaptadas de Zuber *et al.*, (2008).

Los bajos rendimientos de conversión observados por la cepa heteróloga podrían explicarse debido a un efecto tóxico de la acumulación de colesteno en el medio intracelular que no se detecta en los mutantes de *M. smegmatis* que acumulan estos compuestos debido a la presencia de enzimas alternativas que acaban degradándolo (Uhía *et al.*, 2011b). La toxicidad de compuestos intermediarios de la degradación esteroidea así como la existencia de bombas de expulsión para evitar dicha toxicidad ha sido descrita previamente en *R. jostii* RHAI (Swain *et al.*, 2012). Los microorganismos heterólogos que carecen del metabolismo de esteroides también podrían carecer de los mecanismos necesarios para evitar la toxicidad de compuestos intermediarios de la ruta.

Los experimentos de RT-PCR semicuantitativa realizados demostraron que los genes localizados en la zona media y final del operón *mce4* no se están expresando en *C. glutamicum*. Este resultado explica la falta de funcionalidad del operón *mce4* y sugiere la necesidad de un promotor más potente o varios promotores internos para conseguir la expresión de todos los genes del sistema. La optimización de este proceso permitiría realizar una nueva aproximación para el traslado del sistema de transporte activo de colesterol y fitosteroles a *C. glutamicum* y confirmar la potencialidad de este microorganismo como hospedador heterólogo en la producción industrial de compuestos esteroideos de interés.

VIII. CONCLUSIONES

El trabajo descrito en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes conclusiones principales:

1. El transporte activo de colesterol en *M. smegmatis* requiere de al menos 11 proteínas para generar un sistema Mce4 funcional. Estas proteínas incluyen una ATPasa (MceG), dos subunidades permeasa (YrbE4) y ocho proteínas adicionales de función actualmente desconocida (Mce4ABCDEFMas4AB), ninguna de las cuales pueden ser reemplazadas por subunidades homólogas presentes en los otros operones *mce* de *M. smegmatis* mc²155.
2. La ATPasa MceG posee una extensión C-terminal no conservada en ATPasas ABC similares que podría estar implicada en la unión de proteínas adicionales a las presentes en el operón *mce4* y necesarias para el correcto transporte activo de colesterol en *M. smegmatis* mc²155.
3. *Mycobacterium smegmatis* posee un sistema de transporte pasivo de esteroides independiente de Mce4.
4. Los sistemas Mce, incluyendo el sistema Mce4 cuya función ha sido relacionada hasta la fecha únicamente con el transporte de colesterol, están implicados en procesos de transporte de componentes lipídicos presentes en la envoltura celular de *M. smegmatis* mc²155 bajo situaciones de estrés. Este hecho sugiere que probablemente los compuestos esteroideos son capaces de utilizar el sistema Mce4 para transportarse al interior celular por su similitud estructural con algunos lípidos de la envoltura celular.
5. *Corynebacterium glutamicum*, un microorganismo sin metabolismo endógeno de degradación de esteroides ha demostrado su potencial biotecnológico como chasis para la expresión de genes heterólogos útiles para la biotransformación de esteroides.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez E. and Tavel E.** (1885) Recherche sur le bacille de Lustgarten. Archives de Physiologie, Normal et Pathologique, **6**: 303-321.
- Abumrad N., Harmon C., Ibrahimi A.** (1998) Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. J. Lipid Res, **39**: 2309–2318.
- Al-Shawi M.K.** (2011) Catalytic and transport cycles of ABC exporters. Essays Biochem, **50**: 63–83.
- Andor A., Jekkel A., Hopwoo, D.A., Jeanplong F., Ilkőy É., Kónya A., Kurucz I. and Ambrus G.** (2006) Generation of useful insertionally blocked sterol degradation pathway mutants of fast-growing mycobacteria and cloning, characterization, and expression of the terminal oxygenase of the 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in *Mycobacterium smegmatis* mc²155. Applied and Environmental Microbiology, **72**: 6554-6559.
- Andrews S.C., Robinson A.K., Rodriguez-Quinones F.** (2003) Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiol Rev, **27**: 215–37.
- Arima K., Nagasawa M., Bae M. and Tamura G.** (1969) Microbial transformation of sterols. Part I. Decomposition of cholesterol by microorganisms. Agricultural Biology and Chemistry, **33**: 1636-1643.
- Arruda S., Bomfim G., Knights R., Huima-Byron T., Riley L.W.** (1993) Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. Science, **261**: 1454-7.
- Arya S.K., Datta M. and Malhotra B.D.** (2008) Recent advances in cholesterol biosensor. Biosensors and Bioelectronics, **23**: 1083-1100.
- Asselineau J., Lanéelle G.** (1998) Mycobacterial lipids: a historical perspective. Front Biosci, **3**: 164-74.
- Av-Gay Y., Sobouti R.** (2000) Cholesterol is accumulated by mycobacteria but its degradation is limited to non-pathogenic fast-growing mycobacteria. Canadian Journal of Microbiology, **46**: 826-831.
- Azuma I., Kimura H., Niinaka T., Aoki T., Yamamura Y.** (1968) Chemical and immunological studies on mycobacterial polysaccharides. 1. Purification and properties of polysaccharides from human tubercle bacilli. J Bacteriol, **95**: 263-71.
- Baker M.E., and Blasco R.** (1992) Expansion of the mammalian 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/plant dihydroflavonol reductase superfamily to include a bacterial cholesterol dehydrogenase, a bacterial UDP-galactose-4-epimerase, and open reading frames in vaccinia virus and fish lymphocystis disease virus. FEBS Lett, **301**: 89-93.
- Banchio C., Gramajo H.C.** (1997) Medium- and long-chain fatty acid uptake and utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2) : first characterization of a Gram-positive bacterial system. Microbiology, **143**: 2439-2447.
- Barrow W.W., Brennan P.J.** (1982) Isolation in high frequency of rough variants of *Mycobacterium intracellulare* lacking C-mycoside glycopeptidolipid antigens. J Bacteriol, **150**: 381-4.
- Barry C.E., 3rd, Lee R.E., Mdluli K., Sampson A.E., Schroeder B.G., Slayden R.A. and Yuan Y.** (1998) Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. Prog. Lipid Res, **37**: 143–179.
- Belanger A.E., Besra G. S., Ford M.E., Mikusova K., Belisle J.T., Brennan P. J. & Inamine J.M.** (1996) The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall

arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 11919-11924.

Belisle J.T., Pascopella L., Inamine J.M., Brennan P.J., Jacobs W.R. Jr. (1991) Isolation and expression of a gene cluster responsible for biosynthesis of the glycopeptidolipid antigens of *Mycobacterium avium*. *J Bacteriol*, **173**: 6991-7.

Benadie Y., Deysel M., Siko D.G., Roberts V.V., Van Wyngaardt S., Thanyani S.T., Sekanka G., Ten Bokum A.M., Collett L.A., Grooten J., Baird M.S., Verschoor J.A. (2008) Cholesteroid nature of free mycolic acids from *M. tuberculosis*. *Chem Phys Lipids*, **152**: 95-103.

Bensing B. A., Seepersaud R., Yen Y. T., Sullam P. M. (2014) Selective transport by SecA2: an expanding family of customized motor proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**: 1674–1686.

Berger B.R., Christie P.J. (1993) The *Agrobacterium tumefaciens* virB4 gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *J Bacteriol*, **175**: 1723-34.

Berntsson R.P., Smits S.H., Schmitt L., Slotboom D.J., Poolman B. (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett*, **584**: 2606-17.

Besra G.S., Brennan P.J. (1997) The mycobacterial cell wall: biosynthesis of arabinogalactan and lipoarabinomannan. *Biochem Soc Trans*, **25**: 845-50.

Biemans-Oldehinkel E., Doeven M.K., Poolman B. (2006) ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett*, **580**:1023-35.

Björkhem I. and Eggertsen G. (2001) Genes involved in initial steps of bile acid synthesis. *Current Opinion in Lipidology*, **12**: 97-103.

Böhm A., Diez J., Diederichs K., Welte W., Boos W. (2002) Structural model of MalK, the ABC subunit of the maltose transporter of *Escherichia coli*: implications for mal gene regulation, inducer exclusion, and subunit assembly. *J Biol Chem*, **277**: 3708-17.

Böhm A., Boos W. (2004) Gene regulation in prokaryotes by subcellular relocalization of transcription factors. *Curr. Opin. Microbiol*, **7**: 151–156.

Boos W., Böhm A. (2000) Learning new tricks from an old dog. MalT of the *Escherichia coli* maltose system is part of a complex regulatory network. *Trends Genet*, **16**: 404–409.

Boos W., Eppler T. (2002) Prokaryotic binding protein-dependent ABC transporters. *Microbial Transport Systems*, **2002**: 77-114.

Borges-Walmsley M.I., McKeegan K.S., Walmsley A.R. (2003) Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J*, **376**: 313-338.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.

Brennan P.J. (1989) Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev Infect Dis*, **2**: 420-430.

Brennan P.J., Nikaido H. (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*, **64**: 29-63.

- Brennan P.J.** (2003) Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, **83**: 91-7.
- Brown R.L. and Peterson G.E.** (1966) Cholesterol oxidation by soil Actinomycetes. *Journal of General Microbiology*, **45**: 441-450.
- Brzostek A., Śliwiński T., Rumijowska-Galewicz A., Korycka-Machala M. and Dziadek J.** (2005) Identification and targeted disruption of the gene encoding the main 3-ketosteroid dehydrogenase in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*. **151**: 2393-2402.
- Brzostek A., Dziadek B., Rumijowska-Galewicz A., Pawelczyk J. and Dziadek J.** (2007) Cholesterol oxidase is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, **275**: 106-112.
- Brzostek A., Rumijowska-Galewicz A., Dziadek B., Wojcik E.A. and Dziadek J.** (2013) ChoD and HsdD can be dispensable for cholesterol degradation in mycobacteria. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **134**: 1-7.
- Capyk J.K., Kalscheuer R., Stewart G.R., Liu J., Kwon H., Zhao R., Okamoto S., Jacobs W.R., Eltis L.D. and Mohn W.W.** (2009a). Mycobacterial Cytochrome P450 125 (Cyp125) catalyzes the terminal hydroxylation of C27 steroids. *Journal of Biological Chemistry*, **284**: 35534-35542.
- Capyk J.K., D'Angelo I., Strynadka N.C. and Eltis L.D.** (2009b) Characterization of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase, a rieske oxygenase in the cholesterol degradation pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, **284**: 9937-9946.
- Carter D.M. and Radding C.M.** (1971) The role of exonuclease and Beta protein of phage lambda in genetic recombination. Substrate specificity and the mode of action of lambda exonuclease. *J Biol Chem*, **246**: 2502-2512.
- Casabon I., Crow, A.M., Liu J. and Eltis L.D.** (2013a) FadD3 is an acyl-CoA synthetase that initiates catabolism of cholesterol rings C and D in actinobacteria. *Molecular Microbiology*, **87**: 269-283.
- Casabon I., Zhu S.H., Otani H., Liu J, Mohn W.W. , Eltis L.D.** (2013) Regulation of the KstR2 regulon of *Mycobacterium tuberculosis* by a cholesterol catabolite. *Mol Microbiol*, **89**: 1201-1212.
- Casali N., White A.M., Riley L.W.** (2006) Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis mce1* operon. *J Bacteriol*, **188**: 441-9.
- Casali N., Riley L.W.** (2007) A phylogenomic analysis of the actinomycetales *mce* operons. *BMC Genomics*, **8**: 60.
- Chami M., Andreau K., Lemassu A., Petit J.F., Houssin C., Puech V., Bayan N., Chaby R., Daffé M.** (2002) Priming and activation of mouse macrophages by trehalose 6,6'-dicorynomycolate vesicles from *Corynebacterium glutamicum* *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, **32**: 141-147.
- Chang H., Wan Y., Wu S., Fan Z. and Hu J.** (2011) Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. *Water Research*, **45**: 732-740.

- Chao T.C., Buhrmester J., Hansmeier N., Pühler A., Weidner S.** (2005) Role of the regulatory gene *rirA* in the transcriptional response of *Sinorhizobium meliloti* to iron limitation. *Appl Environ Microbiol*, **71**: 5969–82.
- Chen Y.M., Lin E.C.C.** (1991) Regulation of the *adhE* gene, which encodes alcohol dehydrogenase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **173**: 8009-8013.
- Chen S., Oldham M.L., Davidson A.L., Chen J.** (2013) Carbon catabolite repression of the maltose transporter revealed by X-ray crystallography. *Nature*, **499**: 364-8.
- Chipley J.R., Dreyfuss M.S. and Smucker R.A.** (1975) Cholesterol metabolism by *Mycobacterium*. *Microbios*, **12**: 199-207.
- Chitale S., Ehrt S., Kawamura I., Fujimura T., Shimono N., Anand N., Lu S., Cohen-Gould L., Riley L.W.** (2001) Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. *Cell Microbiol*, **3**: 247–254.
- Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E. 3rd, et al.** (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **393**: 537-44.
- Cole S.T., Eiglmeier K., Parkhill J., James K.D., Thomson, N.R., Wheeler P.R., Honore N., Garnier T., Churcher C., Harris D., Mungall K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R.M., Devlin K., Duthoy S., Feltwell T., Fraser A., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Lacroix C., Maclean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., Rutter S., Seeger K., Simon S., Simmonds M., Skelton J., Squares R., Squares S., Stevens K., Taylor K., Whitehead S., Woodward J.R., Barrell B.G.** (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus JA . *Nature*, **409**: 1007-1011.
- Coulombe R., Yue K.Q., Ghisla S. and Vrielink A.** (2001) Oxygen access to the active site of cholesterol oxidase through a narrow channel is gated by an Arg-Glu pair. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 30435-30441.
- Court D.L., Sawitzke J.A., Thomason L.C.** (2002) Genetic engineering using homologous recombination. *Annu Rev Genet*, **36**: 361-388.
- Daffé M., Laneelle M.A., Puzo G.** (1983) Structural elucidation by field desorption and electron-impact mass spectrometry of the C-mycosides isolated from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochim Biophys Acta.*, **751**: 439-43.
- Daffé M. and Draper P.** (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol*, **39**: 131–203.
- Daffé M., Crick D.C., Jackson M.** (2014) Genetics of Capsular Polysaccharides and Cell Envelope (Glyco)lipids. *Microbiol Spectr*, **2**: MGM2-0021-2013.
- Dahl J.L., Kraus C.N., Boshoff H.I., Doan B., Foley K., Avarbock D., Kaplan G., Mizrahi V., Rubin H., Barry C.E.** (2003) The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 10026-31.
- Dainese E., Rodrigue S., Delogu G., Provvedi R., Laflamme L., Brzezinski R., Fadda G., Smith I., Gaudreau L., Palù G., Manganeli R.** (2006) Posttranslational regulation of *Mycobacterium*

tuberculosis extracytoplasmic-function sigma factor sigma L and roles in virulence and in global regulation of gene expression. *Infect Immun*, **74**: 2457-61.

Dandekar T., Snel B., Huynen M., Bork P. (1998) Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact. *Trends Biochem Sci*, **23**: 324-8.

Danilchanka O., Pavlenok M., Niederweis M. (2008) Role of porins for uptake of antibiotics by *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **52**: 3127-3134.

Dao D., Kremer L., Guerardel Y., Molano A., Jacobs Jr. W., Porcelli S. and Briken V. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect Immun*, **72**: 2067–2074.

Datcheva V., Kamernitskii A., Vlahov R., Voishvillo N., Levi V., Reshetova I., Chernoburova E. (1986) Microbiological dehydrogenation of polyfunctional Δ^5 -3 β -acetoxy steroids by *Corynebacterium mediolanum* strain B-964. *Appl Microbiol Biotechnol*, **25**: 14-17.

Datta S., Costantino N., Court D.L. (2006) A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria. *Gene*, **379**: 109-115.

Daughton C.G. and Ternes T.A. (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, **107**: 907-938.

Davidson A.L., Chen J. (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem*, **73**: 241-68.

Davidson A.L., Dassa E., Orelle C., Chen J. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, **72**: 317-64.

Dawson R.J., and Locher K.P. (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature*, **443**: 180-185.

Dean M., Hamon Y., Chimini G. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*, **42**: 1007–17.

Delcour A.H. (2009) Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta*, **1794**: 808-816.

Demain A.L. (1992) Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. *Ciba Foundation symposium*, **171**: 3-16.

Diederichs, K., Diez, J., Grell, G., Muller, C., Breed, J., Schnell, C., Vornheim, C., Boos, W., and Welte, W. (2000) Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *EMBO J*. **19**: 5951-5961

Draper P. (1982) The anatomy of mycobacteria. In “The Biology of the Mycobacteria, Volume 1: Physiology, Identification and Classification (C. Ratledge and J. Stanford, eds.)”, Academic Press, London, pp. 9-52.

Dresen C., Lin L.Y.C., D'Angelo I., Tocheva E.I., Strynadka N. and Eltis L.D. (2010) A flavin dependent monooxygenase from *Mycobacterium tuberculosis* involved in cholesterol catabolism. *Journal of Biological Chemistry*, **285**: 22264-22275.

- Driscoll M.D., McLean K.J., Levy C., Mast N., Pikuleva I.A., Lafite P., Rigby S.E.J., Leys D. and Munro A.W.** (2010) Structural and biochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CYP142: Evidence for multiple cholesterol 27-hydroxylase activities in a human pathogen. *Journal of Biological Chemistry*, **285**: 38270-38282.
- Drzyzga O., Fernández de las Heras L., Morales V., Navarro Llorens J.M. and Perera, J.** (2011) Cholesterol degradation by *Gordonia cholesterolivorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 4802-4810.
- Dubnau E., Chan J., Raynaud C., Mohan V.P., Lanéeelle M.A., Yu K., Quémar A., Smith I., Daffé M.** (2000) Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol Microbiol*, **36**: 630-7.
- Dunphy K.Y., Senaratne R.H., Masuzawa M., Kendall L.V., Riley L.W.** (2010) Attenuation of *Mycobacterium tuberculosis* functionally disrupted in a fatty acyl-coenzyme A synthetase gene fadD5. *J Infect Dis*, **201**: 1232-1239.
- Duurkens R.H., Tol M.B., Geertsma E.R., Permentier H.P., Slotboom D.J.** (2007) Flavin binding to the high affinity riboflavin transporter RibU. *J Biol Chem*, **282**: 10380-6.
- Eckford P.D., Sharom F.J.** (2009) ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev*, **109**: 2989-3011.
- Eiglmeier K., Honoré N., Woods S.A., Caudron B., Cole S.T.** (1993) Use of an ordered cosmid library to deduce the genomic organization of *Mycobacterium leprae*. *Mol Microbiol*, **7**: 197-206.
- Elkins C.A., Mullis L.B.** (2006) Mammalian steroid hormones are substrates for the major RND- and MFS-type tripartite multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, **188**: 1191-1195.
- Ellis H.M., Yu D., DiTizio T., Court D.L.** (2001) High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**: 6742-6746.
- Erkens G.B., Berntsson R.P., Fulyani F., Majsnerowska M., Vujičić-Žagar A., Ter Beek J., Poolman B., Slotboom D.J.** (2011) The structural basis of modularity in ECF-type ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol*, **18**: 755-60.
- Ernst J.D.** (1998) Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, **66**: 1277-1281.
- Etienne G., Villeneuve C., Billman-Jacobe H., Astarie-Dequeker C., Dupont M.A., Daffé M.** (2002) The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface, cell wall properties, and phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*, **148**: 3089-3100.
- Etienne G., Laval F., Villeneuve C., Dinadayala P., Abouward, A., Zerbib D., Galamba A. and Daffé M.** (2005) The cell envelope structure and properties of *Mycobacterium smegmatis* mc(2)155: is there a clue for the unique transformability of the strain? *Microbiology*, **151**: 2075-2086.
- Feltcher M.E., Braunstein M.** (2012) Emerging themes in SecA2-mediated protein export. *Nat. Rev. Microbiol*, **10**: 779-789.

- Feltcher M.E., Gunawardena H. P., Zulauf K. E., Malik S., Griffin J.E., Sassetti C.M., Chen X., Braunstein M.** (2015) Label-free Quantitative Proteomics Reveals a Role for the *Mycobacterium tuberculosis* SecA2 Pathway in Exporting Solute Binding Proteins and Mce Transporters to the Cell Wall. *Molecular & Cellular Proteomics*, **14**: 1501-1516.
- Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiro H.M. and Cabral J.M.S.** (2003) Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme and Microbial Technology*, **32**: 688-705.
- Fernandes P., Cabral J.M.** (2007) Phytosterols: application and recovery methods. *Bioresour Technol*, **98**: 2335-50.
- Fernandes P., Cabral J.M.S. and Flickinger M.C.** (2010) Steroid bioconversion. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Fernandez D., Spudich G.M., Zhou X.R., Christie P.J.** (1996) The *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 lipoprotein is required for stabilization of VirB proteins during assembly of the T-complex transport apparatus. *J Bacteriol*, **178**: 3168-76.
- Fernández de las Heras L., Mascaraque V., García-Fernández E., Navarro-Llorens J.M., Perera J. and Drzyzga O.** (2011) ChoG is the main inducible extracellular cholesterol oxidase of *Rhodococcus* sp. strain CECT3014. *Microbiological Research*, **166**: 403-418.
- Ferreira N.P. and Tracey R.P.** (1984) Numerical taxonomy of cholesterol-degrading soil bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, **57**: 429-446.
- Finkenwirth F., Neubauer O., Gunzenhäuser J., Schoknecht J., Scolari S., Stöckl M., Korte T., Herrmann A., Eitinger T.** (2010) Subunit composition of an energy-coupling-factor-type biotin transporter analysed in living bacteria. *Biochem J*, **431**: 373-80.
- Fletcher J.L., Haber M., Henderson M.J., Norris M.D.** (2010) ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer*, **10**: 147–56.
- Fralick J.A. and Burns-Keliher L.L.** (1994) Additive effect of *tolC* and *rfa* mutations on the hydrophobic barrier of the outer membrane of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **176**: 6404-6406.
- Fujii T., Fujii Y., Machida K., Ochiai A., Ito M.** (2009) Efficient biotransformations using *Escherichia coli* with *tolC acrAB* mutations expressing cytochrome P450 genes. *Biosci Biotechnol Biochem*, **73**: 805-810.
- Fujita Y., Okamoto Y., Uenishi Y., Sunagawa M., Uchiyama T., Yano I.** (2007) Molecular and supra-molecular structure related differences in toxicity and granulomatogenic activity of mycobacterial cord factor in mice. *Microb. Pathog*, **43**: 10-21.
- Gagné F., Blaise C. and André C.** (2006) Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **64**: 329-336.
- Garcia O., Bouige P., Forestier C., Dassa E.** (2004) Inventory and comparative analysis of rice and Arabidopsis ATP-binding cassette (ABC) systems. *J Mol Biol*, **343**: 249-65.

García J.L., Uhía I. and Galán B. (2012) Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria. *Microbial Biotechnology*, **5**: 679-699.

García-Fernández E., Frank D.J., Galán B., Kells P.M., Podust L.M., García J.L., Ortiz de Montellano P.R. (2013) A highly conserved mycobacterial cholesterol catabolic pathway. *Environ Microbiol*, **15**: 2342-59.

García-Fernández E., Medrano F.J., Galán B., García J.L. (2014) Deciphering the Transcriptional Regulation of Cholesterol Catabolic Pathway in Mycobacteria IDENTIFICATION OF THE INDUCER OF KstR REPRESSOR. *Journal of Biological Chemistry*, **289**: 17576-17588.

García-Fernández J., Galán B., Medrano F.J., García J.L. (2015) Characterization of the KstR2 regulator responsible of the lower cholesterol degradative pathway in *Mycobacterium smegmatis*. *Environmental Microbiology Reports*, **7**: 155-163.

Gatfield J., Pieters J. (2000) Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*, **288**: 1647–1650.

Gerber S., Comellas-Bigler M., Goetz B.A., Locher K.P. (2008) Structural basis of trans-inhibition in a molybdate/tungstate ABC transporter. *Science*, **321**: 246-50.

Gioffre A., Infante E., Aguilar D., Santangelo M.P., Klepp L., Amadio A., Meikle V., Etchehoury I., Romano M.I., Cataldi A., Hernández R.P., Bigi F. (2005) Mutation in *mce* operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Microbes Infect* **7**: 325-334.

Glickman M.S., Cox J.S., Jacobs W.R. Jr. (2000) A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell*. **5**: 717–727.

Goodfellow M. and Alderson G. (1977) The actinomycete-genus *Rhodococcus*: A home for the ‘rhodochrous’ complex. *Journal of General Microbiology*, **100**: 99-122.

Griffin J.E., Gawronski J.D., DeJesus M.A., Ioerger T.R., Akerley B.J. and Sassetti C.M. (2011a) High resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLOS Pathogens*, **7**: e1002251.

Griffin J.E. (2011) A Global Analysis of the Adaptations Required for Sterol Catabolism in *Mycobacterium Tuberculosis*: A Dissertation. Tesis Doctoral presentada en la University of Massachusetts Medical School.

Grzegorzewicz A.E., Pham H., Gundi V.A., Scherman M.S., North E.J., Hess T., Jones V., Gruppo V., Born S.E., Korduláková J., Chavadi S.S., Morisseau C., Lenaerts A.J., Lee R.E., McNeil M.R., Jackson M. (2012) Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Nat Chem Biol*, **8**: 334–341.

Gupta K.R., Kasetty S., Chatterji D. (2015) Novel functions of (p)ppGpp and Cyclic di-GMP in mycobacterial physiology revealed by phenotype microarray analysis of wild-type and isogenic strains of *Mycobacterium smegmatis*. *Appl Environ Microbiol*, **81**: 2571-8.

Hancock R.E.W. (1984) Alterations in outer membrane permeability. *Ann. Rev. Microbiol*, **38**: 237-264.

Hanselman T.A., Graetz D.A. and Wilkie A.C. (2003) Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review. *Environmental Science & Technology*, **37**: 5471-5478.

- Hearn E.M., Patel D.R., Lepore B.W., Indic M., van den Berg B.** (2009) Transmembrane passage of hydrophobic compounds through a protein channel wall. *Nature*, **458**: 367-371.
- Hebbeln P., Rodionov D.A., Alfandega A., Eitinger T.** (2007) Biotin uptake in prokaryotes by solute transporters with an optional ATP-binding cassette-containing module. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**: 2909-14.
- Henriksen U., Gether U., Litman T.** (2005) Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2. *J Cell Sci*, **118**: 1417-26.
- Higgins C.F., Ames G.F.** (1981) Two periplasmic transport proteins which interact with a common membrane receptor show extensive homology: complete nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**: 6038-42.
- Higgins C.F.** (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, **8**: 67-113.
- Hirsch D., Stahl A., Lodish H.F.** (1998) A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 8625-9.
- Hoffmann C., Leis A., Niederweis M., Plitzko J.M., Engelhardt H.** (2008) Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**: 3963-7.
- Hogg J.A.** (1992) Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation. *Steroids*, **57**: 593-616.
- Hollenstein K., Frei D.C., Locher K.P.** (2007) Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature*, **446**: 213-16.
- Hollenstein K., Dawson R.J., Locher K.P.** (2007b) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **17**: 412-8.
- Honore N., Bergh S., Chanteau S., Doucet-Populaire F., Eiglmeier K., Garnier T., Georges C., Launois P., Limpai boon T., Newton S., Niang K., del Portillo P., Ramesh G.R., Reddi P., Ridel P.R., Sittisombut N., Wu-Hunter S., Cole S.T.** (1993) Nucleotide sequence of the first cosmid from the *Mycobacterium leprae* genome project: Structure and function of the Rif-Str regions. *Mol Microbiol*, **7**: 207-214.
- Horinouchi S., Ishizuka H. and Beppu T.** (1991) Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis of the NAD(P)-dependent cholesterol dehydrogenase gene from a *Nocardia* sp. and its hyperexpression in *Streptomyces* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**: 1386-1393.
- Horinouchi M., Yamamoto T., Taguchi K., Arai H. and Kudo T.** (2001) Meta-cleavage enzyme gene *tesB* is necessary for testosterone degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. *Microbiology*, **147**: 3367-3375.
- Horinouchi M., Hayashi T., Koshino H., Yamamoto T. and Kudo T.** (2003a) Gene encoding the hydrolase for the product of the meta-cleavage reaction in testosterone degradation by *testosteroni*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 2139-2152.
- Horinouchi M., Hayashi T., Yamamoto T. and Kudo T.** (2003b) A new bacterial steroid degradation gene cluster in *Comamonas testosteroni* TA441 which consists of aromatic-compound degradation genes

for seco-steroids and 3-ketosteroid dehydrogenase genes. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 4421-4430.

Horinouchi M., Hayashi T. and Kudo T. (2004a) The genes encoding the hydroxylase of 3-hydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione in steroid degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **92**: 143-154.

Horinouchi M., Kurita T., Yamamoto T., Hatori E., Hayashi T. and Kudo T. (2004b) Steroid degradation gene cluster of *Comamonas testosteroni* consisting of 18 putative genes from meta-cleavage enzyme gene *tesB* to regulator gene *tesR*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **324**: 597-604.

Horinouchi M., Hayashi T., Koshino H., Kurita T. and Kudo T. (2005) Identification of 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostane-5-oic acid, 4-hydroxy-2-oxohexanoic acid, and 2-hydroxyhexa-2,4-dienoic acid and related enzymes involved in testosterone degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 5275-5281.

Horinouchi M., Hayashi T., Koshino H., Malon M., Yamamoto T. and Kudo T. (2008) Identification of genes involved in inversion of stereochemistry of a C-12 hydroxyl group in the catabolism of cholic acid by *Comamonas testosteroni* TA441. *Journal of Bacteriology*, **190**: 5545-5554.

Horinouchi M., Kurita T., Hayashi T. and Kudo T. (2010) Steroid degradation genes in *Comamonas testosteroni* TA441: Isolation of genes encoding a $\Delta 4(5)$ -isomerase and 3α and 3β -dehydrogenases and evidence for a 100 kb steroid degradation gene hot spot. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **122**: 253-263.

Horvath J. and Kramli A. (1947) Microbiological oxidation of cholesterol with *Azotobacter*. *Nature*, **160**: 639-639.

Howard S.T., Rhoades E., Recht J., Pang X., Alsup A., Kolter R., Lyons C.R., Byrd T.F. (2006) Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of invasive phenotype. *Microbiology*, **152**: 1581-1590.

Hsu F.F., Pacheco S., Turk J., Purdy G. (2012) Structural determination of glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* by high-resolution multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. *J Mass Spectrom*, **47**: 1269-81.

Huang Z., Zhang C., Chen S., Ye F., Xing X. (2013) Active inclusion bodies of acid phosphatase PphoC: aggregation induced by GFP fusion and activities modulated by linker flexibility. *Microbial cell factories*, **12**: 25.

Hunter S.W., Gaylord H., Brennan P.J. (1986) Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. *J Biol Chem*, **261**: 12345-51.

Hunter R.L., Armitage L., Jagannath C., Actor J.K. (2009) TB research at UT-Houston - a review of cord factor: new approaches to drugs, vaccines and the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis*, **89**: S18-S25.

Hvorup R.N., Goetz B.A., Niederer M., Hollenstein K., Perozo E., Locher K.P. (2007) Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. *Science*, **317**: 1387-90.

- Jamet S., Quentin Y., Coudray C., Texier P., Laval F., Daffé M., Fichant G., Cam K. (2015).** Evolution of mycolic acid biosynthesis genes and their regulation during starvation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, JB.00433-15.
- Jackson M., Reinaldo Camacho L., Gicquel B. and Guilhot C. (2001)** Gene replacement and transposon delivery using the negative selection marker *sacB*. *Mycobacterium tuberculosis* Protocols. T. Parish and N. Stoker, Humana Press. **54**: 59-75.
- Jackson C.J., Lamb D.C., Marczylo T.H., Warrilow A.G.S., Manning N.J., Lowe D.J., Kelly D.E. and Kelly S.L. (2002)** A novel sterol 14 α -demethylase/ferredoxin fusion protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* represents a new class of the cytochrome P450 superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 46959-46965.
- Jackson C.J., Lamb D.C., Marczylo T.H., Parker J.E., Manning N.L., Kelly D.E. and Kelly S.L. (2003)** Conservation and cloning of CYP51: a sterol 14 α -demethylase from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **301**: 558-563.
- Jarlier V., Nikaido H. (1990)** Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J Bacteriol*, **172**: 1418-23.
- JCBN (1989)** Nomenclature of steroids. *Pure and Applied Chemistry*, **61**: 1783-1822.
- Johnson E., Nguyen P.T., Yeates T.O., Rees D.C. (2012)** Inward facing conformations of the MetNI methionine ABC transporter: Implications for the mechanism of transinhibition. *Protein Sci*, **21**: 84-96.
- Johnston J.B., Ouellet H. and de Montellano P.R.O. (2010)** Functional redundancy of steroid C26-monooxygenase activity in *Mycobacterium tuberculosis* revealed by biochemical and genetic analyses. *Journal of Biological Chemistry*, **285**: 36352-36360.
- Joly N., Bohm A., Boos W., and Richet E. (2004)** MalK, the ATP-binding cassette component of the *Escherichia coli* maltodextrin transporter, inhibits the transcriptional activator malt by antagonizing inducer binding. *J. Biol. Chem*, **279**: 33123-33130.
- Jones P.M., O'Mara M.L., George A.M. (2009)** ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Trends Biochem. Sci*, **34**: 520–531.
- Joshi S.M., Pandey A.K., Capite N., Fortune S.M., Rubin E.J., Sassetti C.M. (2006)** Characterization of mycobacterial virulence genes through genetic interaction mapping. *Proc Natl Acad Sci*, **103**: 11760-5.
- Jubete E., Loaiza O.A., Ochoteco E., Pomposo J.A., Grande H., Rodríguez J. (2009)** Nanotechnology: A tool for improved performance on electrochemical screen-printed (Bio)Sensors. *Journal of Sensors*. Volume 2009.
- Kadaba N.S., Kaiser J.T., Johnson E., Lee A, Rees D.C. (2008)** The high-affinity *E. coli* methionine ABC transporter: structure and allosteric regulation. *Science*, **321**: 250–3.
- Kendall S.L., Withers M., Soffair C.N., Moreland N.J., Gurcha S., Sidders B., Frita R., Ten Bokum A., Besra G.S., Lott J.S. and Stoker N.G. (2007)** A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, **65**: 684-699.

- Kendall S.L., Burgess P., Balhana R., Withers M., ten Bokum A., Lott J.S., Gao C., Uhia-Castro I. and Stoker N.G.** (2010) Cholesterol utilization in mycobacteria is controlled by two TetR-type transcriptional regulators: *kstR* and *kstR2*. *Microbiology*, **156**: 1362-1371.
- Kerr I.D., Jones P.M., George A.M.** (2010) Multidrug efflux pumps: the structures of prokaryotic ATP-binding cassette transporter efflux pumps and implications for our understanding of eukaryotic P-glycoproteins and homologues. *FEBS J*, **277**: 550–63.
- Khare D., Oldham M.L., Orelle C., Davidson A.L., Chen J.** (2009) Alternating access in maltose transporter mediated by rigid-body rotations. *Mol Cell*, **33**: 528-36.
- Kieslich K.** (1985) Microbial side-chain degradation of sterols. *Journal of Basic Microbiology*, **25**: 461-474.
- Kirchner O., Tauch A.** (2003) Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol*, **104**: 287-99.
- Klepp L.I., Forrellad M.A., Osella A.V., Blanco F.C., Stella E.J., Bianco M.V., Santangelo Mde L., Sasseti C., Jackson M., Cataldi A.A., Bigi F., Morbidoni H.R.** (2012) Impact of the deletion of the six mce operons in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbes Infect.*, **14**: 590-9.
- Knol J., Bodewits K., Hessels G.I., Dijkhuizen L. and van der Geize R.** (2008) 3-Keto-5 α -steroid Δ dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 and its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis* H37 are highly specific enzymes that function in cholesterol catabolism. *Biochemical Journal*, **410**: 339-346.
- Kocincova D., Singh A.K., Beretti J.L., Ren H., Euphrasie D., Liu J., Daffé M., Etienne G., Rey rat J.M.** (2008) Spontaneous transposition of IS1096 or ISMsm3 leads to glycopeptidolipid overproduction and affects surface properties in *Mycobacterium smegmatis*. *Tuberculosis (Edinb)*, **88**: 390–398.
- Korkhov V.M., Mireku S.A., Locher K.P.** (2012a) Structure of AMP-PNP-bound vitamin B12 transporter BtuCD-F. *Nature*, **490**: 367-72.
- Korkhov V.M., Mireku S.A., Hvorup R.N., Locher K.P.** (2012b) Asymmetric states of vitamin B₁₂ transporter BtuCD are not discriminated by its cognate substrate binding protein BtuF. *FEBS Lett*, **586**: 972-6.
- Koronakis V., Eswaran J., Hughes C.** (2004) Structure and function of TolC. The bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem*, **73**: 467–489.
- Kreit J., and Samson N.S.** (2009) Cholesterol oxidase: physiological functions. *FEBS J*, **276**: 6844-6856.
- Kühnau S., Reyes M., Sievertsen A., Shuman H.A., Boos W.** (1991) The activities of the *Escherichia coli* MalK protein in maltose transport, regulation, and inducer exclusion can be separated by mutations. *J. Bacteriol*, **173**: 2180-2186.
- Kulkarni S.K. & Stahl F.W.** (1989) Interaction between the *sbcC* gene of *Escherichia coli* and the *gam* gene of phage lambda. *Genetics*, **123**: 249-253.
- Kumar M., Bose M., Brahmachari V.** (2003) Analysis of Expression Profile of Mammalian Cell Entry (mce) Operons of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, **71**: 6083-6087.

- Kumar A., Chandolia A., Chaudhry U., Brahmachari V., Bose M.** (2005) Comparison of mammalian cell entry operons of mycobacteria: in silico analysis and expression profiling. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **43**: 185-195.
- Lack N., Lowe E.D., Liu J., Eltis L.D., Noble M.E.M., Sim E. and Westwood I.M.** (2008) Structure of HsaD, a steroid-degrading hydrolase, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallographica Section F*, **64**: 2-7.
- Lack N.A., Yam K.C., Lowe E.D., Horsman G.P., Owen R.L., Sim E. and Eltis L.D.** (2010) Characterization of a carbon-carbon hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis* involved in cholesterol metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, **285**: 434-443.
- Ladrón N., Fernández M., Agüero J., Zörn B.G., Vázquez-Boland J.A. and Navas J.** (2003) Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the *choE* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 3241-3245.
- Lakso M., Sauer B., Mosinger B., Lee E.J., Manning R.W., Yu S.H., Mulder K.L., Westphal H.** (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *PNAS USA*, **89**: 6232-6.
- Lamb D.C., Kelly D.E., Manning N.J. and Kelly S.L.** (1998) A sterol biosynthetic pathway in *Mycobacterium*. *FEBS Letters*, **437**: 142-144.
- Lamb D.C., Jackson C.J., Warrilow A.G.S., Manning N.J., Kelly D.E. and Kelly S.L.** (2007) Lanosterol biosynthesis in the prokaryote *Methylococcus Capsulatus*: insight into the evolution of sterol biosynthesis. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1714-1721.
- Lario P.I., Sampson N. and Vrielink A.** (2003) Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: what atomic resolution crystallography reveals about enzyme mechanism and the role of the FAD cofactor in redox activity. *Journal of Molecular Biology*, **326**: 1635-1650.
- Lee Y.C., Ballou C.E.** (1965) Complete structures of the glycopospholipids of mycobacteria. *Biochemistry*, **4**: 1395-404.
- Lee S.S. and Sih C.J.** (1967) Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. XII. Metabolism of hexahydroindanpropionic acid derivatives. *Biochemistry*, **6**: 1395-1403.
- Lee L.S., Strock T.J., Sarmah A.K. and Rao P.S.C.** (2003) Sorption and dissipation of testosterone, estrogens, and their primary transformation products in soils and sediment. *Environmental Science & Technology*, **37**: 4098-4105.
- Lehmann K.B., Neumann R.O., Dold H., Süßmann P.O., Haag F.E., Breed R.S., Boysen H.H., Hansen P.A. and Reiner-Deutsch W.** (1930) *Bacteriology, especially determinative bacteriology*. New York, G. E. Stechert and co. **1**.
- Leonard B.A., Podbielski A., Hedberg P.J., Dunny G.M.** (1996) *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 260-4.
- Lewinson O., Lee A.T., Locher K.P., Rees D.C.** (2010) A distinct mechanism for the ABC transporter BtuCD-BtuF revealed by the dynamics of complex formation. *Nat Struct Mol Biol*, **17**: 332-8.

- Lewis V.G., Ween M.P., McDevitt C.A.** (2012) The role of ATP-binding cassette transporters in bacterial pathogenicity. *Protoplasma*, **249**: 919-42.
- Li J., Vrielink A., Brick P. and Blow D.M.** (1993) Crystal structure of cholesterol oxidase complexed with a steroid substrate: Implications for flavin adenine dinucleotide dependent alcohol oxidases. *Biochemistry*, **32**: 11507-11515.
- Li Z., Karakousis G., Chiu S.K., Reddy G., Radding C.M.** (1998) The Beta protein of phage lambda promotes strand exchange. *J Mol Biol*, **276**: 733-744.
- Lin A.E., Krastel K., Hobb R.I., Thompson S.A., Cvitkovitch D.G., Gaynor E.C.** (2009) Atypical roles for *Campylobacter jejuni* amino acid ATP binding cassette transporter components PaqP and PaqQ in bacterial stress tolerance and pathogen-host cell dynamics. *Infect Immun*, **77**: 4912-24.
- Lin C.W., Wang P.H., Ismail W., Tsai Y.W., El Nayal A., Yang C.Y., Yang F.C., Wang C.H., Chiang Y.R.** (2015) Substrate uptake and subcellular compartmentation of anoxic cholesterol catabolism in *Sterolibacterium denitrificans*. *J Biol Chem*, **290**: 1155-69.
- Liu J., Rosenberg E.Y., Nikaido H.** (1995) Fluidity of the lipid domain of cell wall from *Mycobacterium chelonae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 11254-8.
- Liu J., Barry C.E. 3rd, Besra G.S., Nikaido H.** (1996) Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem*, **271**: 29545-51.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, **25**: 402-408.
- Locher K.P., Lee A.T., Rees D.C.** (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, **296**: 1091-8.
- Mahato S.B. and Garai S.** (1997) Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids*, **62**: 332-345.
- Majewska M.D.** (2007) Steroids and ion channels in evolution: from bacteria to synapses and mind. Evolutionary role of steroid regulation of GABA(A) receptors. *Acta Neurobiol Exp*, **67**: 219-233.
- Malaviya A. and Gomes J.** (2008) Androstenedione production by biotransformation of phytosterols. *Bioresource Technology*, **99**: 6725-6737.
- Mallonee D.H., Hylemon P.B.** (1996) Sequencing and expression of a gene encoding a bile acid transporter from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708. *J Bacteriol*, **178**: 7053-8.
- Marjanovic O., Iavarone A.T., Riley L.W.** (2011) Sulfolipid accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* disrupted in the *mce2* operon. *J Microbiol*, **49**: 441-7.
- Marques M.A., Berrêdo-Pinho M., Rosa T.L., Pujari V., Lemes R.M., Lery L.M., Silva C.A., Guimarães A.C., Atella G.C., Wheat W.H., Brennan P.J., Crick D.D., Belisle J.T., Pessolani M.C.** (2015) The essential role of cholesterol metabolism in the intracellular survival of *Mycobacterium leprae* is not coupled to central carbon metabolism and energy production. *J Bacteriol*, 00625-15.
- Marrakchi H., Lanéelle M.A., Daffé M.** (2014) Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem Biol*, **21**: 67-85.

- Martin C.K.A.** (1977a) Microbial cleavage of sterol side chains. *Advances in Applied Microbiology*, **22**: 29–58.
- Martin C.K.A.** (1977b) Microbial cleavage of sterol side chains. *Advances in Applied Microbiology*. D. Perlman, Academic Press, **Volume 22**: 29-58.
- Martínková L., Uhnáková B., Pátek M., Nešvera J. and Křen V.** (2009) Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, **35**: 162-177.
- McLean K.J., Lafite P., Levy C., Cheesman M.R., Mast N., Pikuleva I.A., Leys D. and Munro A.W.** (2009) The structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP125: Molecular basis for cholesterol binding in a P450 needed for host infection. *Journal of Biological Chemistry*, **284**: 35524-35533.
- Meiswinkel T.M., Gopinath V., Lindner S.N., Nampoothiri K.M., Wendisch V.F.** (2013) Accelerated pentose utilization by *Corynebacterium glutamicum* for accelerated production of lysine, glutamate, ornithine and putrescine. *Microb Biotechnol*, **6**: 131-40.
- Membrillo-Hernández J., Echave P., Cabisco E., Tamarit J., Ros J., y Lin C.C.E.** (2000) Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. *J Biol Chem*, **43**: 33869-33875.
- Miclo A. and Germain P.** (1990) Catabolism of methylperhydroindanediol propionate by *Rhodococcus equi*: evidence of a MEPHIP-reductase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **32**: 594-599.
- Miclo A. and Germain P.** (1992) Hexahydroindanone derivatives of steroids formed by *Rhodococcus equi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**: 456-460.
- Miller W.L.** (1988) Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine Reviews*, **9**: 295-318.
- Miller C.D., Hall K., Liang Y.N., Nieman K., Sorensen D., Issa B., Anderson A.J., Sims R.C.** (2004) Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* isolates from soil. *Microb Ecol*, **48**: 230-238.
- Minnikin D.E.** (1982) Lipids: Complex lipids, their chemistry, biosynthesis, and roles. *The Biology of the Mycobacteria*, eds Ratledge C, Stanford J (Academic, New York), 95–184.
- Mir M., Prsic S., Kang C.M., Lun S., Guo H., Murry J.P., Rubin E.J., Husson R.N.** (2014) Mycobacterial gene *cuvA* is required for optimal nutrient utilization and virulence. *Infect Immun*, **82**: 4104-17.
- Mohn W.W., van der Geize R., Stewart G.R., Okamoto S., Liu J., Dijkhuizen L., Eltis L.D.** (2008) The actinobacterial *mce4* locus encodes a steroid transporter. *J Biol Chem*, **283**: 35368-74.
- Mohn W.W., Wilbrink M.H., Casabon I., Stewart G.R., Liu J., van der Geize R. and Eltis L.D.** (2012) Gene cluster encoding cholate catabolism in *Rhodococcus* spp. *Journal of Bacteriology*, **194**: 6712-6719.
- Moormann M., Zähringer U., Moll H., Kaufmann R., Schmid R. & Altendorf K.** (1997) A new glycosylated lipopeptide incorporated into the cell wall of a smooth variant of *Gordona hydrophobica*. *J Biol Chem*, **272**: 10729-10738.

- Mourez M., Hofnung M., Dassa E.** (1997) Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *EMBO J*, **16**: 3066-77.
- Muniyappa K., Radding C.M.** (1986) The homologous recombination system of phage lambda. Pairing activities of Beta protein. *J Biol Chem*, **261**: 7472-7478.
- Muryoi N., Tiedemann M.T., Pluym M., Cheung J., Heinrichs D.E., Stillman M.J.** (2008) Demonstration of the iron-regulated surface determinant (Isd) heme transfer pathway in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, **283**: 28125-36.
- Muyrers J.P., Zhang Y., Buchholz F., Stewart A.F.** (2000) RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes Dev*, **14**: 1971-1982.
- Nagasawa M., Bae M., Tamura G. and Arima K.** (1969) Microbial transformation of steroids. Part II. Cleavage of sterols side chains by microorganisms. *Agricultural Biology and Chemistry*, **33**: 1644–1650.
- Nakashima N., Tamura T.** (2004) Isolation and characterization of a rolling-circle-type plasmid from *Rhodococcus erythropolis* and application of the plasmid to multiple-recombinant-protein expression. *Appl Environ Microbiol*, **70**: 5557-5568.
- Navas J., González-Zorn B., Ladrón N., Garrido P. and Vázquez-Boland J.A.** (2001) Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Journal of Bacteriology*, **183**: 4796-4805.
- Nelson D.L., Lehninger A.L. and Cox M.M.** (2008) *Lehninger principles of biochemistry*. 5th edition. New York, WH Freeman.
- Nesbitt N.M., Yang X., Fontán P., Kolesnikova I., Smith, I., Sampson N.S. and Dubnau E.** (2010) A thiolase of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence and production of androstenedione and androstadienedione from cholesterol. *Infection and Immunity*, **78**: 275-282.
- Nikaido H.** (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**: 593-656.
- Niederweis M., Danilchanka O., Huff J., Hoffmann C., Engelhardt H.** (2010) Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol*, **18**: 109- 16.
- Oldham M. L., Khare D., Quioco F.A., Davidson A.L., and Chen. J.** (2007) Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature*, **450**: 515-521.
- Oldham M.L., Chen J.** (2011a) Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**: 15152-6.
- Oldham M.L., Chen S., Chen J.** (2013) Structural basis for substrate specificity in the Escherichia coli maltose transport system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**: 18132-7.
- Oldham M.L., Chen J.** (2011b) Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. *Science*, **332**: 1202-5.
- Ooi L.G. and Liong M.T.** (2010) Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of in vivo and in vitro findings. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**: 2499–2522.

Oppermann U., Filling C., Hult M., Shafqat N., Wu X., Lindh M., Shafqat J., Nordling E., Kallberg Y., Persson B., Jörnvall H. (2003) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact*, **143-144**: 247-53.

Ouellet H., Guan S., Johnston J.B., Chow E.D., Kells P.M., Burlingame A.L., Cox J.S., Podust L.M. and De Montellano P.R.O. (2010a) *Mycobacterium tuberculosis* CYP125A1, a steroid C27 monooxygenase that detoxifies intracellularly generated cholest-4-en-3-one. *Molecular Microbiology*, **77**: 730-742.

Ouellet H., Johnston J.B. and Montellano P.R.O. (2011) Cholesterol catabolism as a therapeutic target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in microbiology*, **19**: 530-539.

Owen R.W., Mason A.N. and Bilton R.F. (1983) The degradation of cholesterol by *Pseudomonas* sp. NCIB 10590 under aerobic conditions. *Journal of Lipid Research*, **24**: 1500-1511.

Pajon R., Yero D., Lage A., Llanes A., Borroto C.J. (2006) Computational identification of b-barrel outer-membrane proteins in *Mycobacterium tuberculosis* predicted proteomes as putative vaccine candidates. *Tuberculosis*, **86**: 290-302.

Pall M.L., Kelly K.A. (1971) Specificity of transinhibition of amino acid transport in *Neurospora*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**: 940-947.

Panagiotidis, C.H., Boos W., and Shuman H.A. (1998) The ATP-binding cassette subunit of the maltose transporter MalK antagonizes MalT, the activator of the *Escherichia coli* mal regulon. *Mol. Microbiol.* **30**: 535-546.

Pandey A.K., Sasseti C.M. (2008) Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**: 4376-80.

Park J.T., Raychaudhuri D., Li H., Normark S., Mengin-Lecreulx D. (1998) MppA, a periplasmic binding protein essential for import of the bacterial cell wall peptide L-alanyl-gamma-D-glutamyl-mesodiaminopimelate. *J Bacteriol*, **180**: 1215-23.

Parish T. and Stoker N.G. (1998). *Mycobacteria Protocols*. Totowa, N.J., Humana Press. **101**

Parsi Z. and Górecki T. (2006) Determination of ergosterol as an indicator of fungal biomass in various samples using non-discriminating flash pyrolysis. *Journal of Chromatography A*, **1130**: 145-150.

Pearson A., Budin M. and Brocks J.J. (2003) Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**: 15352- 15357.

Pereira D.I.A. and Gibson G.R. (2002) Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 4689-4693.

Petrusma M., Dijkhuizen L. and van der Geize R. (2009) *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43269 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase, a two-component iron-sulfur-containing monooxygenase with subtle steroid substrate specificity. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 5300-5307.

Petrusma M., Hessels G., Dijkhuizen L. and van der Geize R. (2011) Multiplicity of 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase enzymes in *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269 for specific degradation of different classes of steroids. *Journal of Bacteriology*, **193**: 3931-3940.

- Peyret J.L., Bayan N., Joliff G., Gulik-Krzywicki T., Mathieu L., Schechter E., Leblon G.** (1993) Characterization of the *cspB* gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol*, **9**: 97-109.
- Philipp B., Erdbrink H., Suter M.F. and Schink B.** (2006) Degradation of and sensitivity to cholate in *Pseudomonas* sp. strain Chol1. *Archives of Microbiology*, **185**: 192-201.
- Pinkett H.W., Lee A.T., Lum P., Locher K.P., Rees D.C.** (2007) An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science*, **315**: 373-7.
- Plésiat P., and Nikaido H.** (1992) Outer membranes of Gram-negative bacteria are permeable to steroid probes. *Mol. Microbiol*, **6**: 1323-1333.
- Plésiat P., Aires J.R., Godard C., Köhler T.** (1997) Use of Steroids to monitor alterations in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*, **179**: 7004-7010.
- Poole A.J. and Cord-Ruwisch R.** (2004) Treatment of strongflow wool scouring effluent by biological emulsion destabilisation. *Water Research*, **38**: 1419-1426.
- Puzo G.** (1990) The carbohydrate- and lipid-containing cell wall of mycobacteria, phenolic glycolipids: structure and immunological properties. *Crit Rev Microbiol*, **17**: 305-27.
- Raman D.R., Williams E.L., Layton A.C., Burns R.T., Easter J.P., Daugherty A.S., Mullen M.D. and Sayler G.S.** (2004) Estrogen content of dairy and swine wastes. *Environmental Science & Technology*, **38**: 3567-3573.
- Ramón-García S., Stewart G.R., Hui Z.K., Mohn W.W., Thompson C.J.** (2015) The mycobacterial P55 efflux pump is required for optimal growth on cholesterol. *Virulence*, **6**: 444-8.
- Rathor N., Chandolia A., Saini N.K., Sinha R., Pathak R., Garima K., Singh S., Varma-Basil M., Bose M.** (2013) An insight into the regulation of *mce4* operon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, **93**: 389-97.
- Ream D.C., Asma R., Bankapur I. F.** (2015) An Event-Driven Approach for Studying Gene Block Evolution in Bacteria. *Bioinformatics*, **31**: 2075-83.
- Recht J., Martinez A., Torello S. and Kolter R.** (2000) Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*, **182**: 434-4351.
- Reyes M. and Shuman H.A.** (1988) Overproduction of MalK protein prevents expression of the *Escherichia coli* mal regulon. *J. Bacteriol*, **170**: 4598-602.
- Rice A.J., Harrison A., Alvarez F.J., Davidson A.L., Pinkett H.W.** (2014) Small substrate transport and mechanism of a molybdate ABC transporter in a lipid environment. *J Biol Chem*, **289**: 15005–13.
- Richet E., Joly N., and Danot O.** (2005) Two domains of MalT, the activator of the *Escherichia coli* maltose regulon, bear determinants essential for anti-activation by MalK. *J Mol Biol*, **347**: 1-10.
- Rosłoniec K.Z., Wilbrink M.H., Cpyk J.K., Mohn W.W., Ostendorf M., Van Der Geize R., Dijkhuizen L. and Eltis L.D.** (2009) Cytochrome P450 125 (CYP125) catalyses C26-hydroxylation to

initiate sterol sidechain degradation in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Molecular Microbiology*, **74**: 1031-1043.

Rozwarski D.A., Grant G.A., Barton D.H., Jacobs W.R., Jr. & Sacchettini J.C. (1998) Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, **279**: 98-102.

Saini N.K., Sharma M., Chandolia A., Pasricha R., Brahmachari V., Bose M. (2008) Characterization of Mce4A protein in *Mycobacterium tuberculosis*: role in invasion and survival. *BMC Microbiol*, **8**: 200.

Sambrook J. and Russell D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.

Santamaria R., Gil J.A., Martin J.F. (1985) High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. *J Bacteriol*, **162**: 463-7.

Santangelo Mde L., Blanco F., Campos E., Soria M., Bianco M.V., Klepp L., Alito A., Zabal O., Cataldi A., Bigi F. (2009a) Mce2R from *Mycobacterium tuberculosis* represses the expression of the mce2 operon. *Tuberculosis (Edinb)*, **89**: 22-28.

Santangelo P., Klepp L., Nun J., Blanco F. C., Soria M., García-Pelayo M., Bianco M.V., Cataldi A.A., Golby P., Jackson M., Gordon S.V., Bigi F. (2009b) Mce3R, a TetR-type transcriptional repressor, controls the expression of a regulon involved in lipid metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, **155**: 2245–2255.

Sasseti C. M. & Rubin E.J. (2003) Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 12989–12994

Saurin W., Köster W., Dassa E. (1994) Bacterial binding protein-dependent permeases: characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. *Mol Microbiol*, **12**: 993-1004.

Sawitzke J.A., Thomason L.C., Costantino N., Bubunenko M., Datta S., Court D.L. (2007) Recombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. *Methods Enzymol*, **421**: 171-199.

Scrutton N.S., Berry A. and Perham R.N. (1990) Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature*, **343**: 38-43.

Sedlaczek L. and L., S.L. (1988). Biotransformations of Steroids. *Critical Reviews in Biotechnology*, **7**: 187-236.

Sharan S.K., Thomason L.C., Kuznetsov S.G., Court D.L. (2009) Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat. Protoc*, **4**: 206–223.

Shimono N., Morici L., Casali N., Cantrell S., Sidders B., Ehrt S. and Riley L.W. (2003) Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the *mce1* operon. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**: 15918–15923.

Shuman H.A., Panagiotidis C.H. (1993) Tinkering with transporters: periplasmic binding protein-dependent maltose transport in *E. coli*. *J Bioenerg Biomembr*, **25**: 613-20.

- Sih C.J., Wang K.C., Gibson D.T. and Whitlock H.W.** (1965) On the mechanism of ring A cleavage in the degradation of 9,10-seco steroids by microorganisms. *Journal of the American Chemical Society*, **87**: 1386-1387.
- Sih C.J., Ta H.H., Tsong Y.Y., Lee S.S. and Coombe R.G.** (1968a) Mechanisms of steroid oxidation by microorganism. XIV. Pathway of cholesterol side-chain degradation. *Biochemistry*, **7**: 808-818.
- Sih C.J., Wang K.C. and Tai H.H.** (1968b) Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. XIII. C22 acid intermediates in the degradation of the cholesterol side chain. *Biochemistry*, **7**: 796-807.
- Sih C.J. and Whitlock H.W.** (1968c) *Biochemistry of Steroids*. *Annual Review of Biochemistry*, **37**: 661-694.
- Slaytor M. and Bloch K.** (1965) Metabolic transformations of cholestenediols. *Journal of Biological Chemistry*, **240**: 4598-4602.
- Snapper S.B., Melton R.E., Mustafa S., Kieser T. and Jr W.R.J.** (1990) Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology*, **4**: 1911-1919.
- Sobel H. and Plaut A.** (1974) The assimilation of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, **57**: 377-382.
- Söhngen N.L.** (1913) Benzin, petroleum, paraffinöl und paraffin als kohlenstoff- und energiequelle für mikrobien. *Zentr Bacteriol Parasitenk Abt II*, **37**: 595-609.
- Somalinga V. and Mohn W.W.** (2013) *Rhodococcus jostii* Porin A (RjpA) Functions in Cholate Uptake. *Appl Environ Microbiol*, **79**: 6191-6193.
- Song H., Sandie R., Wang Y., Andrade-Navarro M.A., Niederweis M.** (2008) Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, **88**: 526-544.
- Sonomoto K., Usui N., Tanaka A., Fukui S.** (1983) 9 α -hydroxylation of 4-androstene-3,17-dione by gel-entrapped corynebacterium sp. cells. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, **17**: 203-210.
- Stahl C., Kubetzko S., Kaps I., Seeber S., Engelhardt H., Niederweis M.** (2001) MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol*, **40**: 451-464.
- Stavrum R., Valvatne H., Stavrum K., Riley L.W., Ulvestad E., Jonassen I., Doherty T.M., Grewal H.M.S.** (2012) *Mycobacterium tuberculosis* Mce1 protein complex initiates rapid induction of transcription of genes involved in substrate trafficking. *Genes and Immunity*, **13**: 496-502.
- Steck P.A., Schwartz M.S., Rosendhal G., Gray R.** (1978) Mycolic acids: a reinvestigation. *J Biol Chem*, **253**: 5625-5709.
- Stephan J., Mailaender C., Etienne G., Daffé M., Niederweis M.** (2004) Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **48**: 4163-4170.
- Stover C.K., de la Cruz V.F., Fuerst T.R., Burlein J.E., Benson L.A., Bennett L.T., Bansal G.P., Young J.F., Lee M.H., Hatfull G.F., et al.** (1991) New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*, **351**: 456-60.

- Subramanian K., Rutvisuttinunt W., Scott W., Myers R.S.** (2003) The enzymatic basis of processivity in lambda exonuclease. *Nucleic Acids Res*, **31**: 1585-96.
- Sutcliffe I.C.** (1998) Cell envelope composition and organisation in the genus *Rhodococcus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **74**: 49-58.
- Swain K., Casabon I., Eltis L.D., Mohn W.W.** (2012) Two transporters essential for reassimilation of novel cholate metabolites by *Rhodococcus jostii* RHA1. *J Bacteriol*, **194**: 6720-7.
- Swank R.T. and Munkres K.D.** (1971) Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Analytical Biochemistry*, **39**: 462-477.
- Szentirmai A.** (1990) Microbial physiology of sidechain degradation of sterols. *Journal of Industrial Microbiology*, **6**: 101-115.
- Szklarczyk D., Franceschini A., Kuhn M., Simonovic M., Roth A., Minguéz P., Doerks T., Stark M., Müller J., Bork P., Jensen L.J., von Mering C.** (2011) The STRING database in 2011: Functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res*, **39**: D561–D568.
- Tahlan K., Wilson R., Kastrinsky D.B., Arora K., Nair V., Fischer E., Barnes S.W., Walker J.R., Alland D., Barry C.E., 3rd, Boshoff H.I.** (2012) SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell Wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents Chemother*, **56**: 1797–1809.
- Tak J. D.** (1942) On bacteria decomposing cholesterol. *Antonie van Leeuwenhoek*, **8**: 32-40.
- Tamaoka J., Ha D.M. and Komagata K.** (1987) Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov., with an emended description of the genus *Comamonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **37**: 52-59.
- Tao L., Sutcliffe I.C., Russell R.R., Ferretti J.J.** (1993) Transport of sugars, including sucrose, by the msm transport system of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*, **72**: 1386-90.
- Tarlera S., Denner E.B.** (2003) *Sterolibacterium denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel cholesterol-oxidizing, denitrifying member of the beta-Proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*, **53**: 1085-91.
- Tartoff K.D. and Hobbs C.A.** (1987) Improved media for growing plasmid and cosmid clones, Bethesda Research Laboratories, **9**:12
- Ter Beek J., Guskov A., Slotboom D.J.** (2014) Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol*, **143**: 419-35.
- Thomas S.T. and Sampson N.S.** (2013) *Mycobacterium tuberculosis* utilizes a unique heterotetrameric structure for dehydrogenation of the cholesterol side chain. *Biochemistry*, **52**: 2895-904.
- Tsukamura M.** (1976) Properties of *Mycobacterium smegmatis* freshly isolated from soil. *Japanese journal of microbiology*, **20**: 355-356.
- Turfitt G.E.** (1944) Microbiological agencies in the degradation of steroids: I. The cholesterol-decomposing organisms of soils. *Journal of Bacteriology*, **47**: 487-493.

- Turfitt G.E.** (1948) The microbiological degradation of steroids: 4. Fission of the steroid molecule. The Biochemical journal, **42**: 376-383.
- Uhía I.** (2010) Análisis genético y bioquímico del catabolismo del colesterol en *Mycobacterium smegmatis* mc²155. Tesis Doctoral. (Universidad Complutense de Madrid).
- Uhía I., Galán B., Medrano F.J. and García J.L.** (2011a) Characterization of the KstR-dependent promoter of the gene for the first step of the cholesterol degradative pathway in *Mycobacterium smegmatis*. Microbiology, **157**: 2670-2680.
- Uhía I., Galán B., Morales V. and García J. L.** (2011b) Initial step in the catabolism of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis* mc²155. Environmental Microbiology, **13**: 943-959.
- Uhía I., Galán B., Kendall S.L., Stoker N.G. and García J.L.** (2012) Cholesterol metabolism in *Mycobacterium smegmatis*. Environmental Microbiology Reports, **4**: 168-182.
- van den Berg B.** (2005) The FadL family: unusual transporters for unusual substrates. Curr Opin Struct Biol, **15**: 401-407.
- Van der Geize R., Hessels G.I., van Gerwen R., Vrijbloed J.W., van der Meijden P. and Dijkhuizen L.** (2000) Targeted disruption of the *kstD* gene encoding a 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase isoenzyme of *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. Applied and Environmental Microbiology, **66**: 2029-2036.
- Van der Geize R., Hessels G.I., van Gerwen R., van der Meijden P. and Dijkhuizen L.** (2001) Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker. FEMS Microbiology Letters, **205**: 197-202.
- Van der Geize R., Hessels G.I. and Dijkhuizen L.** (2002a) Molecular and functional characterization of the *kstD2* gene of *Rhodococcus erythropolis* SQ1 encoding a second 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase isoenzyme. Microbiology, **148**: 3285-3292.
- Van der Geize R., Hessels G.I., Gerwen R.V., Meijden P.V.D. and Dijkhuizen L.** (2002b) Molecular and functional characterization of *kshA* and *kshB*, encoding two components of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. Molecular Microbiology, **45**: 1007-1018.
- Van der Geize R., Yam K., Heuser T., Wilbrink M.H., Hara H., Anderton M.C., Sim E., Dijkhuizen L., Davies J.E., Mohn W.W. and Eltis L.D.** (2007) A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences, **104**: 1947-1952.
- Van der Geize R., Hessels G.I., Nienhuis-Kuiper M. and Dijkhuizen L.** (2008) Characterization of a second *Rhodococcus erythropolis* SQ1 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase activity comprising a terminal oxygenase homologue, *KshA2*, active with oxygenase-reductase component *KshB*. Applied and Environmental Microbiology, **74**: 7197-7203.
- Van der Geize R., Grommen A.W.F., Hessels G. I., Jacobs A.A.C. and Dijkhuizen L.** (2011) The steroid catabolic pathway of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* is important for pathogenesis and a target for vaccine development. PLOS Pathogens, **7**: e1002181.
- Van Heijenoort J.** (2001) Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. Glycobiology, **11**: 25R-36R.

- Van Kessel J.C., Hatfull G.R.** (2007) Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Methods*, **4**: 147-152.
- Van Kessel J.C., Marinelli L.J., Hatfull G.R.** (2008) Recombineering mycobacteria and their phages. *Nat rev Microbiol*, **6**: 851-857.
- Veiga P., Juste C., Lepercq P., Saunier K., Béguet F., and Gérard P.** (2005) Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut. *FEMS Microbiology Letters*, **242**: 81-86.
- Verdon G., Albers S.V., Dijkstra B.W., Driessen A.J.M., and Thunnissen A.M.** (2003) *J Mol Biol*, **330**: 343-358.
- Vergne L., Daffé M.** (1998) Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells *Front. Biosci*, **3**: d865-d876.
- Vigonsky E., Ovcharenko E., Lewinson O.** (2013) Two molybdate/tungstate ABC transporters that interact very differently with their substrate binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**: 5440-5.
- Villalba M.S., Álvarez H.M.** (2014) Identification of a novel ATP-binding cassette transporter involved in long-chain fatty acid import and its role in triacylglycerol accumulation in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Microbiology*, **160**: 1523-1532.
- Villeneuve M., Kawai M., Kanashima H., Watanabe M., Minnikin D.E., Nakahara H.** (2005) Temperature dependence of the Langmuir monolayer packing of mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1715**: 71-80.
- Villeneuve M., Kawai M., Watanabe M., Aoyagi Y., Hitotsuyanagi Y., Takey K., Gouda H., Hirono S., Minnikin D.E., Nakahara H.** (2007) Conformational behavior of oxygenated mycobacterial mycolic acids from *Mycobacterium bovis* BCG. *Biochim Biophys Acta*, **1768**: 1717-1726.
- Wang L., Slayden R. A., Barry C. E., 3rd and Liu J.** (2000) Cell wall structure of a mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids. *J Biol Chem*, **275**: 7224-7229.
- Wang T., Fu G., Pan X., Wu J., Gong X., Wang J., Shi Y.** (2013) Structure of a bacterial energy-coupling factor transporter. *Nature*, **497**: 272-6
- Warwick J.B., Paul W., Winter N.** (1994) Mechanisms of persistence of mycobacteria. *Trends Microbiol*, **2**: 284-288.
- Whitmarsh J.M.** (1964) Intermediates of microbiological metabolism of cholesterol. *Biochemical Journal*, **90**: 23.
- Wiener M.C., Horanyi P.S.** (2011) How hydrophobic molecules traverse the outer membranes of Gram-negative bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**: 10929-10930.
- Wilbrink M.H., Petrusma M., Dijkhuizen L. and van der Geize R.** (2011) FadD19 of *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269, a steroid-coenzyme A ligase essential for degradation of C-24 Branched sterol side chains. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 4455-4464.
- Wolschendorf F., Mahfoud M., Niederweis M.** (2007) Porins are required for uptake of phosphates by *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol*, **189**: 2435-2442.

Woo J.S., Zeltina A., Goetz B.A., Locher K.P. (2012) X-ray structure of the *Yersinia pestis* heme transporter HmuUV. *Nat Struct Mol Biol*, **19**: 1310-5.

Wülfing C., and Plückthun A. (1994) Correctly folded T-cell receptor fragments in the periplasm of *Escherichia coli*. Influence of folding catalysts. *J. Mol. Biol.*, **242**: 655-669.

Xu K., Zhang M., Zhao Q., Yu F., Guo H., Wang C., He F., Ding J., Zhang P. (2013) Crystal structure of a folate energy-coupling factor transporter from *Lactobacillus brevis*. *Nature*, **497**: 268-71.

Yam K.C., D'Angelo I., Kalscheuer R., Zhu H., Wang J.X., Snieckus V., Ly L.H., Converse P.J., Jacobs W.R., Jr. Strynadka N. and Eltis L.D. (2009) Studies of a ring-cleaving dioxygenase illuminate the role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS Pathogens*, **5**: e1000344.

Yang X., Dubnau E., Smith I. and Sampson N.S. (2007) *Rv1106c* from *Mycobacterium tuberculosis* is a 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemistry*, **46**: 9058-9067.

Yang X., Gao J., Smith I., Dubnau E. and Sampson N.S. (2011) Cholesterol is not an essential source of nutrition for *Mycobacterium tuberculosis* during infection. *Journal of Bacteriology*, **193**: 1473-1476.

Yang M., Lu R., Guja K.E., Wiperman M.F., St Clair J.R., Bonds A.C., Garcia-Diaz M., Sampson N.S. (2015) Unraveling Cholesterol Catabolism in *Mycobacterium tuberculosis*: ChsE4-ChsE5 α 2 β 2 Acyl-CoA Dehydrogenase Initiates β -Oxidation of 3-Oxo-cholest-4-en-26-oyl CoA. *ACS Infect Dis*, **1**: 110-125.

Yue Q.K., Kass I.J., Sampson N.S. and Vrielink A. (1999) Crystal structure determination of cholesterol oxidase from streptomyces and structural characterization of key active site mutants. *Biochemistry*, **38**: 4277-4286.

Zhang P., Wang J., Shi Y. (2010) Structure and mechanism of the S component of a bacterial ECF transporter. *Nature*, **468**: 717-20.

Zuber B., Chami M., Houssin C., Dubochet J., Griffiths G., Daffé M. (2008) Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol*, **190**: 5672-80.